臺灣省農業試驗所特刊第57號

植物保護新科技研討會專刊

中華民國八十四年九月十四～十五日
於臺灣省農業試驗所國際會議廳舉行

羅朝村、周樑鎰　主編

行政院農業委員會　補助
臺灣省農業試驗所　主辦
中華植物保護學會　協辦

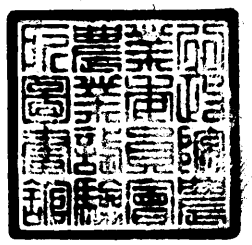
臺灣省農業試驗所　編印
中華民國八十五年六月

臺灣省農業試驗所特刊第57號

植物保護新科技研討會專刊

中華民國八十四年九月十四～十五日
於臺灣省農業試驗所國際會議廳舉行

羅朝村、周樑鎰　主編



行政院農業委員會　補助
臺灣省農業試驗所　主辦
中華植物保護學會　協辦

臺灣省農業試驗所　編印
中華民國八十五年六月

Taiwan Agric. Res. Inst., Spec. Publ. No. 57

Proceeding of A Symposium on New Techniques of Plant Protection

Held at Taiwan Agricultural Research Institute,
Taiwan, Republic of China,
September, 14-15, 1995

Edited by
Chao-Tsun Lo and Liang-Yih Chou

Published by
Taiwan Agricultural Research Institute
Wufeng, Taichung, Taiwan, R.O.C.
June, 1996

植物保護新科技研討會



農林廳杜副廳長金池致詞

朱理事長、沈副所長、葉小姐、各位專家學者、各位女士、各位先生大家早安：

邱廳長因公務出國，未能親自前來參加植物保護新科技研討會，本人僅代表農林廳表示衷心歡迎之意。事實上這個研討會是由本人所發起的，因此今天抱著萬分興奮心情來參與這個研討會，也可以藉這個機會向在座學者專家表示由衷的敬佩各位在植物保護新科技上的貢獻。

台灣省農業試驗所爲了慶祝成立一百周年，今年特舉辦一系列的學術研討會，這系列研討會分別包括重要的作物別及科技別。舉辦研討會除慶祝所慶、回顧過去的研究成果外，更將做爲擬訂農業試驗所跨入二十一世紀之研究方向的重要參考依據。植物保護是重要農業科技之一，因此在研擬研討會主題時，我跟農委會植物保護科陳科長商量，陳科長非常贊同並表示充分支持，徵得植物保護學會朱理事長的同意合辦，遂開始進行籌備工作，趁此機會特別說出本次研討會的原由以資紀念。

我們都知道植物保護現代化，已經是農業耕作不可或缺的。假若缺乏現代化的植物保護科技，我們要減少農產品在生產過程中的損失，以及提高農產品的品質，將是緣木求魚。臺灣人口的不斷增加，耕地面積相對減少，高度密集的耕作制度及高溫高濕環境下，植物病蟲害是農作產量與品質的重要殺手，幸賴植物保護的同仁，能夠不斷研究出新的科技及新的技術，使我們單位面積產量不斷的提高，才能夠滿足社會對於吃的需求量。近年來社會經濟突飛猛進，人們不但要吃得飽吃得好，更要吃得安全吃得健康，不僅僅希望買到的農產品未發生病蟲害，更不願意買到用化學農藥防治病蟲害的農產品，這種需求在消費者看來非常單純，但在農業經濟經營上是十足兩難與矛盾的工作。爲了解決這些問題，都要依賴植物保護的同仁，不斷研究新的技術來面對整個社會的需求。

另一方面而言，貿易國際化是必然的趨勢，農產品貿易自由化亦是一個擋不住的風潮，我們若無完善的植物保護檢疫制度，萬一有新病蟲害被引進，臺灣的本土農產品將會受到嚴重損害，要開展農產品的第二春將永遠不可能實現。因此我們植物保護的同仁面臨時代挑戰，可以說是比任何科學類門重要。

我們看看本次研討會的內容，包括植物病蟲害的鑑定與診斷、抗病蟲害品種的育種、植物病蟲害的抗藥性、檢疫處理及生物防治等等。這幾個主題內容豐富，非常切合時代的需要，對植物保護承先起後，將發揮很大的作用，研討會各主題的所有成果都是植物保護界的學者及工作同仁共同參與，所以這個研討會成功是可以預期的。我在這裡特別重申，謝謝植物保護學會共同舉辦這個研討會慶祝農業試驗所一百周年所慶，希望這個研討會讓植物保護工作在大家心中烙下更深的印象，激發出更多新的知識。由於大家這兩天的腦力激盪，未來植物保護新知識將不斷的開發，不斷的提供農民應用。最後預祝大會成功，謝謝大家光臨，並祝福大家在研究方面成功、身體健康、事事如意、謝謝大家。

行政院農業委員會葉博士瑩致詞

杜副廳長、朱理事長、各位貴賓、各位專家學者、各位女士、各位先生大家早！今天非常高興參加這個盛會，因爲農委會孫主任委員、農糧處古處長和植保科陳科長，因公出國不克前來參加，所以我僅在此代表農委會向大會及各位致意。農業試驗所成立一百周年紀念活動，能聯合中華植物保護學會共同舉辦「植物保護新技術研討會」，顯示植物保護研究是貴所相當重要的一部份，舉辦這個研討會不但對貴所植物保護研究有新的啓示，對國內植物保護學者專家也是一個難得的機會，大家齊聚一堂，共同討論植物保護新技術的發展。

我國即將加入關貿總協，爲因應貿易自由化的趨勢，對未來二十一世紀的農業經營亦必須做適當的調整。永續農業是未來世界農業發展的潮流，也是我國未來農業發展的重點方向，植物保護新技術是配合農業新方向很重要的一環，植物保護研究方面我們必須妥善來規劃，所以這個研討會的舉辦深具意義。當我國加入關貿總協後，國內農業將無法避免的會受到某種程度的衝擊，政府農業機關無論行政或研究人員均須同心協力設法減少衝擊，就像剛才杜副廳長所提到的，我們植物保護工作同仁將面對一個大挑戰，也是一個很重要的時代考驗。

這兩天研討會內容涵蓋很多重要的項目，這些也是我們所須面對努力的重點方向。農委會這幾年來補助了相當多的經費供發展植物保護新科技，譬如生物防治、生物技術、非農藥技術及檢疫處理技術等。這個研討會是一個很好的機會，一方面研究人員可以把近年來研究成果呈現出來，另方面希望在座學者專家能將精闢的經驗和寶貴意見提供給農委會，做爲規劃因應加入關貿總協後農業新趨勢調適的參考資料，俾將有關植物保護的農業政策及研究新重點方向做一個很妥善的規劃。另外，農委會的農業綜合調整方案即將於八十六年度結束，該方案結束後，亦必須規劃進入一個新的農業時代，希望這個研討會也能提供一些很好的意見，也希望國內未來植物保護的科技研究發展能達到國際級水準，相信這也是大家所期待的。

最後謹在此祝大會順利成功，也祝大家身體健康，謝謝！

植物保護學會朱理事長耀沂致詞

長官、各位植物保護界先進，大家好：

今天代表植物保護學會向各位致詞，我覺得非常榮幸，但現在的植物保護新科技發展很快、變化很多，像我這種老頭子站在這裡好像有點怪怪的。現在科技的發展已經超過我可以瞭解的範圍，但是我也瞭解新科技的重要性。剛剛杜副廳長講過，今年是農業試驗所成立一百周年，想想一百年前，那時候的人平均壽命三十多歲，生活在台灣的人，現在的平均壽命已經七十多歲了，增加二倍以上。這個現象應歸功於社會學、經濟學、醫學各方面的發展。

其中也不能忽略農業對它的貢獻，才能將平均壽命拉長到兩倍以上。翻閱一百年前，就是日據時代開始時期之相關文獻即知；當時單位面積的糧食生產量大致每公頃二噸。然目前大多數的作物生產量已提高到其兩倍以上。此種豐富且高品質的食物供給，與平均壽命之延長，絕對有密切的關係。農產品之增產，當然要歸功於作物栽培、育種、施肥、水利等技術之發展才能達到的。但若缺乏植物保護技術之支援，再好的栽植方式也無法發揮它的功能。

正如，我們在生活中追求更好的生活品質般，現在的農業也朝向追求更高產量、高品質上發展。從以上的事實即知；此時期的植物保護工作要扮演的角色也極爲重要。而要達到此任務，我們一定要應用植物保護的新科技。

在此我代表植物保護學會，希望今、明兩天的研討會中討論出來的結果，在以後的農業發展能用得上，進而開闢我們更好的明天。

最後祝大家健康、生活快樂，工作進行的很順利。 謝謝！

農業試驗所沈副所長再發致歡迎詞

杜副廳長、朱理事長及各位貴賓大家好：

今天這個植物保護新科技研討會是由農業試驗所主辦，中華植物保護學會協辦。因爲林所長陪同廳長至法國及德國開會，不克親自主持研討會，指派本人代理，我僅代表農試所向各位專家及貴賓的光臨表示歡迎與感謝之意。

植物保護新科技對我來說，談不上跟各位來討論，以園藝生產者來談這個問題是班門弄斧。可是以生產者立場來說，剛剛杜副廳長、葉博士及朱理事長都提過，農業生產目標都在追求要得到更高的產量與品質時，每項生產要素都是不可或缺的一環。植物保護對園藝方面來說越來越顯得特別重要。剛剛所談的不論是減少損失或提高品質，均有賴各位專家學者提供新開發的技術來解決問題，還有一些資材也希望能給我們介紹。

近代農民經營農業管理上很重要的一項，就是對環境重視時代已來臨，人們發現農業生產似乎有過量使用農藥的情形發生。近年來植物保護科技日新月異，病蟲害防治的觀念不斷的創新、調整和進步。今天我們藉著研討會這個機會互相交換經驗與心得，由互相討論帶給我們更多的啓發及思考，規劃如何將新科技引進，或國內自行研發，不斷開發新技術及新觀念，並能提出解決一些重要防治問題的對策。

許多先進的國家，他們在農業備忘錄上，把農業技術、生物防治列爲實施的重點，像荷蘭到公元二千年要把農藥使用量降到50％。所以這次研討會，最後的綜合討論中心議題就是生物防治，植物保護未來發展針對這個問題來討論。杜副廳長於掌農試所所長時規劃農試所一百週年慶之學術活動，就把這個研討會列爲當中的一項。新的一百年我們要做那些事，實在需要好好籌繆，這研討會應可以提供農試所在植物保護研究方面一個很好的方向。

最後代表農業試驗所特別感謝農委會給予經費的支持，還有最初籌劃這個研討會的杜副廳長、多位籌備委員及工作人員在匆促的時間內很辛苦的籌備，使今天的研討會能順利的進行，更感謝各位長官、貴賓、各位女士先生熱烈的參與。敬祝各位身體健康，謝謝。

植物保護新科技研討會會議議程表

84年9月14日（星期四）

08:00-09:00	報到		
09:00-10:00	開幕式及攝影		
10:00-10:30	休息		

第一節 鑑定及診斷　主持人：羅幹成、謝文瑞

10:30-11:00	地理資訊系統(GIS)及全球定位系統(GPS)在蟲害管理上之應用	林試所 臺灣大學	趙榮台 孫志鴻
11:00-11:30	害蟲鑑定新技術：生化電腦及聲波分析技術之應用	科博館	楊曼妙
11:30-12:00	近代生物技術在植物病原眞菌偵測及診斷之應用	中興大學	陳隆鐘、余瑞卿 賴學珍、王志宏
12:00-12:30	植物病毒鑑定及診斷新技術	農試所	張清安
12:30-14:00	午餐/休息		

第二節 抗病蟲品種育種　主持人：潘榮松、孫守恭

14:00-14:30	園藝作物抗蟲育種	農試所	陳炳輝
14:30-15:00	木瓜輪點病毒鞘蛋白轉基因木瓜之抗病性	中興大學	鄭櫻慧、葉錫東
15:00-15:30	怎樣做好抗稻熱病育種	中研院	吳信淦
15:30-16:00	休息		

第三節 抗藥性　主持人：古德業、李國欽

16:00-16:30	昆蟲抗藥性研究的回顧與展望	中研究	馬堪津
16:30-17:00	農藥殘毒快速檢驗技術之研發	農試所	鄭　允、高靜華 邱紀松
17:00-17:30	殺菌劑抗藥性發生之監測與預防	農藥所	楊秀珠

84年9月15日（星期五）

第四節 檢疫處理、誘引技術　主持人：陳連勝、候豐男

08:30-09:00	檢疫殺蟲處理技術	檢驗局	林志祥
09:00-09:30	誘殺劑應用上之數項問題	臺灣大學	朱耀沂
09:30-10:00	茶蠶的性費洛蒙研究	中研院	周延鑫
10:00-10:30	休息		

第五節 生物防治　主持人：杜金池、吳文希

10: 30- 11: 00	生物防治在作物病害管理上的應用與發展	農試所	羅朝村
11: 00- 11: 30	農業廢棄物防治作物病害的展望	中興大學	黃振文
11: 30- 12: 00	雜草生物防治	農藥所	蔣慕琰
12: 00- 12: 30	午餐/休息		

第六節 生物防治　主持人：蘇宗宏、陳秋男

13: 30- 14: 00	利用昆蟲病毒防治害蟲	農藥所	高穗生
14: 00- 14: 30	天敵的遺傳改良	農試所	何琦琛、羅幹成
14: 30- 15: 00	昆蟲桿狀病毒殺蟲劑之研究：生物技術之應用	臺灣大學	王重雄
15: 00- 15: 30	休息		

綜合討論　主持人：古德業、陳秋男、杜金池、范國洋
林俊義、朱耀沂、蘇鴻基

15: 30- 16: 30　中心議題：生物技術在植物保護未來之發展潛力

1. 對病蟲害防治之應用前景如何?
2. 試驗研究單位和學校如何分工配合加速發展?
3. 經費預算及行政方面如何配合?

目　　錄

鑑定及診斷

地理資訊系統(GIS)及全球定位系統(GPS)在蟲害管理上之應用……趙榮台、孫志鴻　1
害蟲鑑定新技術：生化電腦及聲波分析技術之應用……楊曼妙　11
近代生物技術在植物病原眞菌偵測及診斷之應用……陳隆鐘、余瑞卿、賴學珍、王志宏　23
植物病毒鑑定及診斷新技術……張清安　35

抗病蟲品種育種

園藝作物抗蟲育種……陳炳輝　47
木瓜輪點病毒鞘蛋白轉基因木瓜之抗病性……鄭櫻慧、葉錫東　57
怎樣做好抗稻熱病育種……吳信淦　65

抗　藥　性

昆蟲抗藥性研究的回顧與展望……馬堪津　71
農藥殘毒快速檢驗技術之研發……鄭　允、高靜華、邱紀松、周桃美、李月嫦、曾佳琳　87
殺菌劑抗藥性發生之監測與預防……楊秀珠　95

檢疫處理、誘引技術

檢疫殺蟲處理技術……張芳基、陳弘毅、林志祥　109
誘殺劑應用上之數項問題……朱耀沂　117
茶蠶的性費洛蒙研究……周延鑫　133

生物防治

生物防治在作物病害管理上的應用與發展……羅朝村　141
農業廢棄物防治作物病害的展望……黃振文　151
雜草生物防治……蔣慕琰　159
利用昆蟲病毒防治害蟲……高穗生　161
天敵的遺傳改良……何琦琛、羅幹成　181
昆蟲桿狀病毒殺蟲劑之研究：生物技術之應用……王重雄　193

綜合討論

主持人：古德業、陳秋男、杜金池、范國洋、林俊義、朱耀沂、蘇鴻基……　203
附錄一、研討會籌備委員及工作人員一覽表……　207

「植物保護新科技研討會」專刊
臺灣省農業試驗所特刊第57號 pp. 1-10 (1996)

地理資訊系統(GIS)及全球定位系統(GPS)在蟲害管理上之應用

趙榮台[1] 孫志鴻[2]

[1]臺灣省林業試驗所森林保護系

[2]國立台灣大學地理學系

摘要：地理資訊系統(geographic information system, 簡稱GIS)是一種能輸入(input)、儲存(storage)、分析(analysis)、展示(display)及尋取(retrieve)空間資訊(spatial information)的軟體系統(通常也包含硬體在內)。除了早期診斷、尋找與相關的因子之外，根據其資料庫內的各種環境資訊，配合電腦模式，GIS可以預測植物在未來受到蟲害感染的風險、時間、地點、分佈範圍、死亡率及經濟損失，從而提供土地管理者及早訂定防治決策，進行管制或發展必要的研究計畫。全球定位系統(global positioning system, 簡稱GPS)則是使用者透過能接收衛星訊號的接收器，精確、迅速達到標定地面座標的系統。GPS所標出病蟲害發生地點或分佈的經緯度，誤差範圍僅有數公尺或數十公尺。GPS所測得的座標資料能完美地納入GIS，結合多重資訊，從事更詳盡的蟲害動態監測(monitoring)。本文介紹這兩種系統的基本原理和功能，同時也討論將GIS與GPS應用在蟲害管理上的實例。

關鍵詞：地理資訊系統、全球定位系統、蟲害管理。

前　言

過去30年，許多專業、學域對於使用具有時間、空間特性資訊的需求，越來越大。於是地理資訊系統(geographic information system, 簡稱GIS)這個能夠自動儲存、分析、展示地理資料的嶄新科技，就在市場的需求下，迅速發展，應用到各種專業、各類工作上。例如自動化的地理資訊系統已經應用在軍事、工程、地籍、火災事件、犯罪事件、人口統計、土地規劃等的繪圖，它也可以應用在環境監測、自然資源管理和都市計畫上。

另外一個原本用在軍事、導航的科技產品－全球定位系統(global positioning system, 簡稱GPS)，在後冷戰時期解禁，並逐漸發展出形形色色的商業產品，供人快速、精確地定出經緯座標，例如今天的登山者可以藉著掌上型的GPS在很短的時間內定出自己所在的位置，不必再帶著一大堆地圖上山了。最近大多數上市的GPS還標榜它們具有結合GIS的功能，使兩個系統相得益彰，發揮更高的效率。這些先進的科技可不可以用在蟲害防治上呢？答案是肯定的。事實上，已經有一些GIS和GPS應用在蟲害防治和昆蟲調查的先例可供參考。

我們從CAB International截至1995年8月的文獻資料庫中找出18篇以GIS(含GPS)應用在蟲害管理的期刊報告(表1)。表1顯示以這兩種工具應用在昆蟲專業的研究報告處於萌芽階段，其數量

並不算多，但卻有逐漸增加的趨勢。表1也顯示這樣的應用主要出自於北美地區，在亞洲還沒有人發表類似的研究[8]的報告雖然在韓國發表，卻是在美國科羅拉多州做的)。本文的目的就是要介紹GIS、GPS以及它們在昆蟲學，尤其是蟲害管理上的應用。我們相信，隨著科技的進步與跨學域的統合，這些工具必然會在昆蟲學專業產生更大的影響，其發展動向值得我們關注。

表一、以GIS (含GPS) 應用在蟲害管理 (pest management) 的18篇期刊報告分析 (據 CAB International 1995年9月前文獻資料庫)

Table 1. An analysis of 18 journal papers (obtained from CAB Intemational database by September 1995) that relate to applications of GIS (including GPS) on pest management

Year	No. of papers	Geographic Area	No. of papers
1988 & 1989	2	North America	13
1990 & 1991	4	Europe	3
1992 & 1993	5	Africa	2
1994 & 1995	7		

地理資訊系統的原理與結構

GIS是一種能輸入(input)、儲存(storage)、分析(analysis)、展示(display)及尋取(retrieve)空間資訊(spatial information)的軟體系統(通常也包含硬體在內)。GIS是一套工具，它可以藉著標準的座標系統，整合空間資訊形成一個資料庫(database)，然後透過查詢、分析，模擬各種狀況，提供決策者衡量、判斷。因此GIS是理想的決策支援系統(decision support system, DSS)，可以協助決策者有效地管理生物、政治、經濟或土地有關的資源。由此看來，只要建立充分、完整的資料庫，GIS一樣可以幫我們做好蟲害管理的決策。GIS的空間資訊，包括了位置資料(locational data，例如點、線、面、地形、座標等)以及屬性(attributes，例如變數、數值、名字等)，而位置資料和屬性資料必須彼此相互關聯。此外，GIS更重要的特性是它還涵蓋了第三個元素－時間。雖然不同的GIS軟體對各種數據有不同的設計和管理方式，但是基本上都在處理這三類的數據。

地理資訊系統本身有四個主要的組成，亦即輸入、管理、分析應用及展示。在資料輸入方面，可以利用鍵盤、掃描器、數化儀(digitizer)或錄音等方式。有些位置資料需要透過數化儀加以數化(digitize)。有些數化的過程要靠人工操作(manual)，還有一些則是自動的(automatic)。例如美國的大地衛星(landsat)和一些影像處理(image processing)設備能夠自動地把衛星影像轉換爲具有座標系統的衛星影像，以便與GIS資料整合。當基本資料輸入之後，還有許多繁複的處理(processing)和編輯(editing)工作，這些工作相當系統化而且技術性，因此不擬在本文中詳述。至於GIS的資料分析功能基本上包括了空間資料處理(spatial manipulation)、空間資料分析(spatial analysis)、數值地形分析(digital terrain analysis)、網路分析(network analysis)等，由於電腦的發展日新月異，GIS的分析能力也日益多元化。最後，GIS還能迅速地尋取資料，將之展示出來。在視覺上，GIS的空間形態(spatial pattern)展示功能有很大的溝通效果，極具說服力。

GIS在蟲害管理上的應用

GIS應用在森林學上已有數十年的歷史，無怪乎它在蟲害管理上的應用也以森林蟲害管理爲最早。以加拿大爲例，太平洋區森林每年因昆蟲所造成的林木死亡超過2,500萬立方公尺，大約是年收穫量的1/3。森林蟲害問題也使木材外銷在檢疫(quarantines)上受阻，並造成立地、美學和遊樂上的損失，而火災發生的風險更大爲提高。加拿大林務署的森林病蟲害調查局(Forest Insects and Disease Survey, FIDS)每年都調查並報告森林病蟲害的現況，做爲森林經營決策、區域、國家、國際植物檢疫管制、以及研究發展計畫的參考之用。加拿大在1940年代即以航空調查(aerial survey)偵測森林蟲害並予以製圖，1960年後，這些空中調查已納入例行調查。從大面積的林地來看，航照圖一直是一年一度從事蟲害偵測和初步調查最有效的步驟。過去以人力判識、分析的空中調查資料(含各種森林病蟲害圖)，如今都已輸入GIS。每年的航空調查之後，技術員便入將目前的森林感染區域(polygon)數化 ，並將害蟲種類、嚴重程度、年度、林區和圖檔編號等屬性輸入GIS。在校正誤差之後，今年的感染情形與前一年的感染情形可以立刻在電腦螢幕上分別出來。各省林務局、木材業者和國家公園等相關單位依其需要，結合數十到上百張的電腦輸出圖，就能進行預防蟲害的規劃工作 (詳見 Van Sickle[16])。

美國也是最早把GIS應用在蟲害防治上的國家之一，美國農部林務署(USDA Forest Service)及其相關單位所擁有的森林病蟲害的調查資料、圖檔更是詳盡。1869年從歐洲引進美國的舞毒蛾(gypsy moth, *Lymantria dispar*) 在20世紀前已成爲美國東北區重要的林木害蟲，從此造成週期性猖獗，以1981年爲例，舞毒蛾曾使1,300萬英畝的林地落葉殆盡。百年的爲害歷史以及長期累積的調查、研究資料使舞毒蛾具備充分應用GIS分析的條件。比方說把美國大煙山國家公園(Great Smoky Mountains National Park)人類的可及性(accessibility) 與舞毒蛾除葉 (defoliation) 程度這兩個因子納入GIS的模型(model)之後，決定了國家公園內除葉的數量，並根據北美過去蟲害除葉情況所判定的死亡級別系統(mortality rating system) 評估大煙山國家公園內闊葉林的脆弱程度 (vulnerability)。國家公園也藉著GIS就舞毒蛾的危害進行危險評估 (hazard assessment)，展示可能會造成林木大量死亡的地區。有了這些分析和地圖，大煙山國家公園負責經營管理的行政部門在舞毒蛾還沒有造成損害之前，就已經有了可以被大眾接受的防治對策[1]。舞毒蛾這類外來害蟲歷年擴散的情形也可以利用GIS顯示出來, Liebhold *et al.*[9]把彙集的歷史記錄納入GIS分析，把1900-1990年間舞毒蛾在北美擴張速率的變化分成四個階段，由於實際觀測的分佈範圍擴張速率高過理論計算值，他們才能提出舞毒蛾的擴散可能與人爲因素有關的推論。Liebhold *et al.*[10] 又彙集了1969-1989年賓州舞毒蛾造成的林地除葉航照圖，這些資料輸入GIS之後便能區分最易受害的林型(例如火炬松/短葉松(loblolly pine/shortleaf pine)林)和最不易受害的林地(例如山毛櫸(beech)林)，這一方面可以瞭解舞毒蛾偏好取食的樹種，另一方面則可以供未來育林、經營之參考。以上這些分析都要使用大量的疊圖以及圖上多邊形(polygon)的裁切、合成等，如果沒有GIS，工作根本不可能完成。

除了舞毒蛾之外，還有一些以GIS應用在森林昆蟲的例子。1987年西部捲葉螟(western spruce budworm) 啃食83萬4千多公頃的花旗松 (douglas-fir) 葉片，造成英屬哥倫比亞省有史以來最嚴重的蟲害。西部捲葉螟蟲專吃當年新葉，因此連續數年下來，損失就十分嚴重。欲了解受害最嚴重

的地區和程度，將1983-1988年的除葉圖疊圖分析，結果顯示1/2的受害區在6年中只有1年林木葉片被啜盡，36%連續兩年被除葉，15%連續3-4年被除葉，只有1%連續5-6年被除葉。Lee [8]以GIS將森林立地特性(stand characteristics)、氣象條件(weather conditions)、地形因子(topographic factors)等介量(parameter)疊圖(overlay)分析，製做成山松小蠹蟲(mountain pine beetle)的危險指標圖(hazard index map)，這對蟲害預警、森林經營和整體規劃都有實質助益。Power and D'Eon [12]則以GIS處理昆蟲爲害圖(pest infestation map)和森林調查圖(forest inventory map)，以相關資料庫管理系統(relational database management system, RDBMS)處理枯竭因子(depletion factors)並加以統計，他們用這個方法找出最容易受害的林地，同時估算出雲杉捲葉蛾(spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*)幼蟲造成之森林枯竭(forest depletion)。Doggett and Tweed [4]收集北卡羅萊那州1960-80年的資料以GIS架構南方松小蠹(southern pine beetle, *Dendroctonus frontalis*)的地理分佈圖。他們利用每千英畝寄主樹木(大多爲松樹)中的受害數(以點(spots)表示)代表小蠹蟲的密集程度，把這些點標在圖上，鑑定出受害最嚴重的地區。

蟲害診斷是害蟲管理中重要的一環，因爲只有確認受害情形與區域，才能執行蟲害的防治工作。在蟲害偵測方面，Chamignon and Maniere [2]利用歐洲發射的SPOT衛星偵測法國東南區的森林覆蓋並評估昆蟲爲害。他們發現以XS3波段最容易區分植被型態(水域、草原、森林等)和森林中的樹種，而利用多光譜資料(multispectral data)以及植被指數差異就能評估 *Larix decidua* 被 *Zeiraphera diniana* 爲害的情形。Orland [11]結合遙測(remote sensing)影像、地面影像和GIS的視覺影像，用來展示昆蟲爲害(食葉昆蟲和小蠹蟲)的效應、昆蟲猖獗早期樹冠層的顏色改變以及森林結構的改變，這種技術當然也有利早期的蟲害偵測，從而預謀對策。Everitt *et al.* [6]用彩色紅外線和黑白近紅外線(near-infrared)錄影影像偵測美國德州 Lower Rio Grande Valley 的柑橘粉蝨 *Aleurocanthus woglumi* 爲害，蚜蟲引起的煤煙菌(sooty mould fungus, *Capnodium citri*)使得葉片產生明顯的灰黑影像，受害柑橘樹的近紅外線數化錄影影像(digitized video images)的數值則比未受害的柑橘顯著爲低，因此可以迅速診斷大面積柑橘的受害情形。

GIS是很好的跨學域統合工具，過去病蟲害分佈型態和生物地理氣候區、氣象因子、林型、坡度等的相關性很難評估與量化，GIS使得這些分析均能順利進行。像Jagtap[7]將烏干達(Uganda)全國種植香蕉之地區的生態狀況數據輸入GIS分析，成功地求出香蕉病蟲害水平和生產損失的關係。花旗松毒蛾(Douglas-fir tussock moth)取食花旗松幼林和成林的葉片，造成生長緩慢甚至死亡。加拿大森林病蟲害調查局自1916年地記錄了8次花旗松毒蛾猖獗的圖片。每次猖獗的期間持續1-4年。將這些8次猖獗的圖片與森林棲地(forest habitat)和氣候圖重疊，就能指出最易感染的區域和最容易造成猖獗的關鍵氣候狀況[16]。Dull *et al.* [5]以16種資料檔(包括地形、交通、水文、雲杉球蚜(balsam woolly adelgid, *Adelges piceae*)的歷史和干擾歷史等)納入GIS分析，結果算出美國東南部高海拔有26,610 ha的雲杉/冷杉(spruce/fir)林，其中大多數都在衰退之中。他們將森林的死亡率分級，發現樹木死亡率隨海拔高度而增加，也與雲杉球蚜的爲害一致。Veblen *et al.* [17]將在科羅拉多的洛磯山脈林地中林火、雪崩(snow avanlanches)及雲杉小蠹蟲(spruce beetle, *Picea engelmennii*)大發生的空間和時間型態調查結果輸入GIS分析，以計算不同干擾因子影響的範圍，並檢驗不同干擾的空間關係。結果顯示林火大發生在1470、1630和1870年代，雲杉小蠹蟲大發生約在1716、1827和1949年。大約在1633年以後9%的調查區域受到雪崩影響，38.6%受到小蠹蟲的影響，而59.1%則受到林火的影響。平均每 202年發生一次大雪崩，每116.5年有一次小蠹蟲大發

生。火災或大雪崩等干擾之後，荒廢的林地無法支持足夠的雲杉小蠹蟲造成大發生，可以解釋何以近來林火和蟲害大發生的時間分佈沒有重疊的現象。

找出適合猖獗的環境因子和猖獗的限制因子，就能預測未來猖獗發生的時間和地點，更重要的是，GIS可以預先估計在某種氣候變化的狀況下(例如大氣污染和全球暖化)，因蟲害造成的損失可能有多大。GIS可以展示植物和蟲害的分佈以及作物生產的其他屬性，並做成模型(modelling)把這些多重的資料庫輸入同一個座標系統。此外，加上氣象和高度資料，就可以監測並預測病蟲害的發展。GIS已用在預測舞毒蛾的物候學發展(phenological development)，同樣的技術也用在馬鈴薯晚疫病(potato late blight, *Phytophthora infestans*) 和蘋果瘡痂病 (apple scab, *Venturia aenqualis*)[14]。事實上，大多數GIS都有一套資料的空間分析(spatial analysis) 程式，所以用它預估蟲害的發展和大發生的風險便就方便多了。Coop *et al.*[3] 以GIS評估奧勒崗州梨木蝨 *Cacopsylla pyricola* 對擬除蟲菊酯抗性(Pyrethroid resistance) 的發展。每年在開花前噴撒兩次擬除蟲菊酯，害蟲就可能產生抗性，並在10-12年內就無法繼續控制蟲害。Wood et al.[18] 在加州北部和中部 的野外資料顯示，稻株的冠層 (canopy) 越早形成，稻田越靠近家畜牧場，則其分佈在240,000 ha 水稻田內的瘧蚊 *Anopheles freeborni* 幼蟲族群越大。以遙測偵測稻作冠層發展的反射測計，並以GIS測計稻田和牧場的距離，就可以區分蚊子幼蟲數量多寡的稻田。在蚊子幼蟲族群達到巔峰的前兩個月，就已經可以用上述分析區分出這兩類稻田，預測準確度高達90%。Tappan *et al.*[15] 以綠度 (greenness) 做成植被指標影像圖(vegetation index image maps), 預估植被的狀況，再將這些數據與數化的地圖資料 (digital cartographic data)輸入GIS, 用以監測 (monitoring) 可能的跳蝗 (grasshopper) 以及飛蝗 (locust, *Schistocera gregaria*) 棲地，以便預測蝗蟲族群的變化。

全球定位系統的原理及其在蟲害管理上的應用

全球定位系統是由美國國防部(U. S. Department of Defense, 簡稱DoD)以衛星爲基礎的無線電導航系統(navigation system)。爲維持該系統之運轉，DoD固定地維護24顆GPS衛星，無論天氣狀況如何，GPS均可以提供24小時的全球導航能力。

GPS的組成包括了1)衛星；2)控制系統；3)使用者。所有的衛星都在與赤道呈55° 傾斜的6個軌道面繞著地球打轉。每一軌道都是圓形，距離地面20,183公里。每一顆衛星發出兩段無線電頻率：α_1 在1575.42 MHz; α_2 在1227.6 MHz，做爲定位之用。使用者的接收器 (receiver) 如果能同時接收四顆以上衛星的訊號，計算它和各衛星的距離，經過三角定位(triangulation)，便產生接收器(亦即使用者)的絕對位置(absolute location)。許多遙測系統 (remote sensing system) 現在也把GPS納入，經過訓練的作業人員可以順利地把GPS用來繪製立地的界限、公路或步徑的調查地區。GPS 的精確度由接收設備以及數據處理方式而定。衛星是美國發射的，因此美國國防部隨時都能以選擇性取得 (Selective Availability, 簡稱SA) 降低GPS的精準度。SA的設定能降低民用導航接收器密碼，使其對位置(position)之計算誤差達到數百公尺之遠。不過，有了微分校正(differential correction)之後，SA的誤差幾乎已被完全排除。

使用GPS之前，應該先考慮一個基本問題：「爲配合日後的分析，我要搜集的資料應該精確到什麼程度？」假如日後要把目前的GPS資料輸到一個100m × 100m方格 (grid) 的GIS，那麼，40公尺到 100公尺的誤差都在可以接受的範圍。但是，如果要確認某一植株的位置，則其誤差就不

能大於2 公尺。同樣的，昆蟲爲害或農藥污染面積的估算也不必像劃定伐木基地或保留區疆界那麼準確。

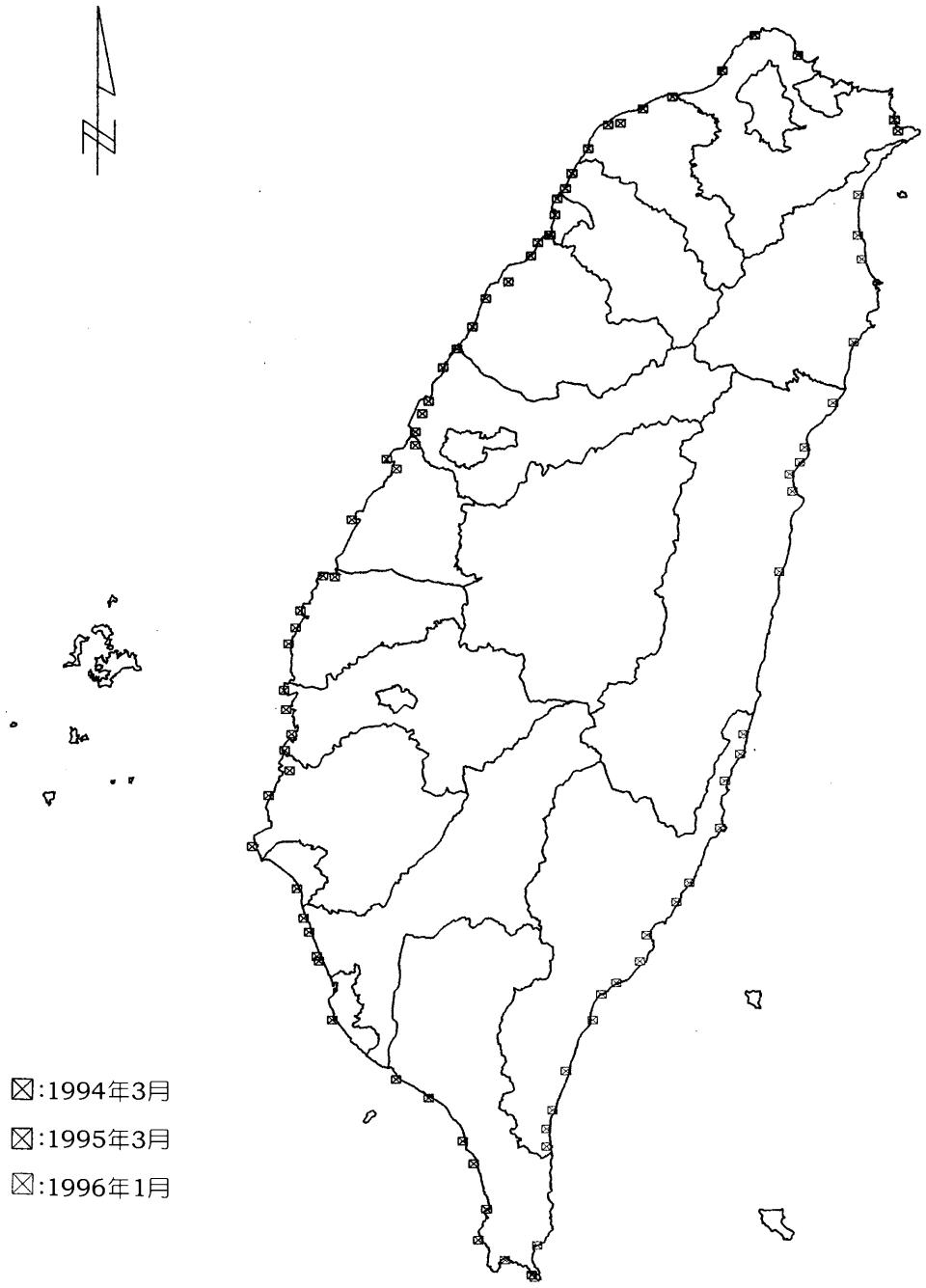
資料精確程度的要求，攸關資料搜集設備的選擇。基本上，接收器分爲誤差以公分計的調查級(survey-grade) 和誤差以公尺爲單位的製圖級 (mapping-grade)。調查級的接收器必須在某一點(site)停留相當時間，不能用在動態狀況，而且它的費用也極其昂貴。製圖級的接收器應足以符合蟲害管理的需要。如果有兩個接收器同時監測同一顆衛星的話，大多數接收器的誤差都不到5公尺。其中一個接收器(基站，base station) 必須放在已知的座標，另一個接收器(移動站，rover) 只要在距離基站600公里之內使用，日後都可以將移動站獲得的資料對照基站加以微分校正。如果移動站以非靜態(not stationary)的方式搜集資料，校正後的誤差可能會大到15公尺。不論那一型接收器，垂直(高度，elevation) 讀數誤差通常都是水平讀數誤差的2-3倍。

在經費不足只能購買一個接收器的狀況下，獲取誤差數十公尺的經緯座標仍然比沒有這些資料要好。如果只有一個接收器，如何降低誤差呢？解決的辦法是透過關係，請其他擁有接收器的單位或個人在你定位的同時打開他(們)的接收器，也就是說你可以把他人的接收器當做基站，以自己的接收器做移動站，定位之後再與該基站微分校正提高精準度，這不失爲一個既省錢又可以得到精確經緯座標的方法。

GPS除了確定‘點’的位置，也可以用來確認‘線’和‘面’。線如果要劃定一塊昆蟲爲害的地區，取得座標觀測資料之後，需經過下列步驟，才能製圖：(1)將資料從接收器灌到電腦上；(2)計算並進行微分校正(無基站者不必此道手續)；(3)去掉未經修正之點的檔案；(4)求得每一檔案的平均位置；(5)求每一區所有檔案之和；(6)繪圖(plotting)。GPS不但能取代手繪(hand-sketchs)、快速地勾勒爲害範圍，同時還能提供害蟲空間分佈(spatial distribution)的資訊。當然，只要合乎格式，GPS資料也可以順利結合GIS，做更多元、更深入的分析，例如 Everitt *et al.*[6] 就利用GPS記錄蚜蟲爲害地點的經緯座標，把這些座標輸入GIS之後，不但劃出受害果園的範圍，同時也有利於日後持續監測這片大面積果園的受害情形。本文第一作者及其研究同仁目前進行海岸防風林黑角舞蛾 (*Lymantria xylina*) 的調查，每個樣區都以GPS定位，並輸入GIS(圖1)。這些記錄的資料使任何人都能回到樣區重複調查或長期觀察樣區受害的變化 (趙榮台，未發表資料)。以上都是GPS結合GIS應用在蟲害管理上的實例。

結　　語

"Pest control"這個名詞從1940年代起逐步演變爲"integrated pest control"、"pest management"，到了1970年代初期改成 "Integrated Pest Managemant, IPM(綜合管理)"之後，就不再有重大改變。可是晚近環境、社會與科技的快速變化，使得IPM無論在觀念和內涵都面臨必須再加斟酌的地步[13]。IPM需要綜合各種知識做成決策，而許多的知識在今日都强烈依賴電腦科技。除了專家系統(expert system)、遙測和其他新科技以外，Sarrenmaa[13] 特別提出 “昆蟲學家應該强調把GIS 帶進(這個領域)的重要性……” ，Seem [14]則說明了GIS 處理大量蟲害和其相關環境資料、數據的能力，以及GIS在蟲害發展風險評估上的優異特性，這些都可以幫助我們解決昆蟲學專業所面對的新挑戰。



圖一、以GPS記錄在台灣沿海防風林內調查黑角舞蛾(*Lymantria xylina*)卵塊的地點，將這些地點的座標輸入GIS後的列印展示(趙榮台，未發表資料)。

Fig. 1. GIS output map of study sites for a *Lymantria xylina* egg-mass survey along the coastal windbreaks of Taiwan. Precise coordinate data of each site was recorded by GPS and entered into a GPS system (Chao *et al.*, unpublished data).

本文已提及GIS的功能與應用，舉凡全國或地區的歷史資料，例如蟲害之鑑定、寄主、分佈、發生頻率和週期都可以納入GIS從事分析。資料庫可以聯結成爲巨集 (batch mode)，而各種地圖都能存入、輸出、可以重疊、並分析它和害蟲的分佈、歷史、植物調查、生物地理、物候、行政界限、氣象或其他因子的關係。分析的結果有助於評估害蟲的分佈是否已經擴張？可能的蟲害所造成的風險有多高？協助檢疫和管制的決策，展示受害區以便規劃防治工作，並比較害蟲和其他因子的關係。GPS則可以提供全時間、全方位的準確位置資料。執行野外試驗時，全球定位系統是一個快速、可靠的工具。它可以用來精確快速地畫出地理範圍 (boundaries)、改善手繪地圖，同時也能更新 (updating) 航空照片 (aerial photographs)。另一方面，它也可以用來確定生物(例如昆蟲)的空間分佈。在這兩個層面，GPS都能和GIS相結合，發揮更大的功用。由於GPS所測到的座標 (coordinate) 都存在電腦檔案裡，不但可以隨時到原座標點重複取樣，同時使得日後持續監測 (monitoring) 野外試驗的動態改變也成爲可能。

使用電腦的人在最近幾年見證電腦科技的突飛猛進，我們一方面感受快速轉換所引起的衝擊，訝異電腦的威力，另一方面又享受電腦帶來的方便。同樣，以資訊和通訊科技爲基礎的GIS與GPS也已經開始帶給各種專業類似的革命性改變。在一切快速運轉的時代，我們也將享受GIS與GPS的發展所帶來更多研究、管理上的方便。GIS和GPS在蟲害管理上的應用勢必愈來愈見廣泛，我們希望更多昆蟲專業人士投入，在這些嶄新的科技領域和昆蟲學的交集上發展。

謝　辭

本文承林業試驗所森林保護系梁素珠、陳景亭協助繕打、編輯，陸聲山協助稿件處理及製圖，特此申謝。

參考文獻

1. Barret, H. R., and S. C. Nodavin. 1991. The use of GIS in evaluating impacts of hardwood forestry by the gypsy moth (*Lymantria dispar*). GIS/LIS '91 Proceedings. p.834 (Abstract)
2. Chamignon, C., and R. Maniere. 1990. Forest cover type mapping and damage assessment of Zeiraphera diniana by SPOT 1 HRV data in the Mercantour National Park. International Journal of Remote Sensing 11(8): 1439-1450.
3. Coop, L. B., B. A. Croft, and H. Riedl. 1994. Pear psylla development of pyrethroid resistance: geographic information systems analysis. Bulletin OILB/SROP 17(2): 43-47.
4. Doggett, C. A., and D. R. Tweed. 1994. Geographical intensity of southern pine beetle infestations. Southern Journal of Applied Forestry 18(4): 145-146.
5. Dull, C. W., J. D. Ward, H. D. Brown, G. W. Ryan, W. H. Clerke, and R. J. Uhler. 1988. Evaluation of spruce and fir mortality in the southern Appalachian mountains. Protection Report - Southern Region, USDA Forest Service (No. R8-PR-13): ix+92pp.
6. Everitt, J. H., D. E. Escobar, K. R. Summy, and M. R. Davis. 1994. Using airborne video, global positioning system, and geographical information system technologies for detecting and mapping

citrus blackfly infestations. Southwestern Entomologist 19(2) : 129-138.

7. Jagtap, S. S. 1993. Diagnostic survey site selectionvusing GIS for effective biological and integrated control of Highland banana pests. p.25-36. in C. S. Gold and B. Gemmill(eds.) Biological and integrated control of highland banana and plantain pests and diseases: Proceedings of a Research Coordination Meeting. International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Ibadania, Niger.
8. Lee, K. S. 1989. Geographic information systems (GIS) use in forest pest management: a simulated study on mountain pine beetle infestation. Journal of Korean Forestry Society 78(2): 168-176.
9. Liebhold, A. M., A. J. Halverson, and G. A. Elmes. 1993. Gypsy moth invasion in North America: a quantitative analysis. Journal of General Virology 74(1): 513-520.
10. Liebhold, A. M., G. A. Elmes, J. A. Halverson, and J. Quimby. 1994. Landscape characterization of forest susceptibility to gypsy moth defoliation. Forest Science 40(1): 18-29.
11. Orland, B. 1994. Visualization techiques for incorporation in forest planning geographic information systems. Landscape and Urban planning 30(1/2):83-97.
12. Power, J. M., and S. P. D, Eon. 1991. Quantifying pest-caused forest depletion using geographic information systems and database technologies. Information Report - Petawawa National Forestry Institute, Forestry Canada (No. PI-X-105): iv +17pp.
13. Saarenmaa, H. 1992. Integrated pest management in forests and information technology. Journal of Applied Entomology 114(4): 321-332.
14. Seem, R. C. 1993. Geographic information systems for localized pest predictions. Bulletin OEPP 23(4): 639-646.
15. Tappan, G. G., D. G. Moore, and W. I. Knausenberger. 1991. Monitoring grasshopper and locust habitats in Sahelian Africa using GIS and remote sensing technology. International Journal of Geographical Information Systems 5(1): 123-135.
16. Van Sickle, G. A. 1989. GIS---A tool in forest pest management. GIS Applications in Natural Resources. pp.349-353.
17. Veblen, T. T., K. S. Hadley, E. M. Nel, T. Kitzberger, M. Reid, and R. Villalba. 1994. Disturbance regime and disturbance interactions in a Rocky Mountain subalpine forest. Journal of Ecology 82 (1): 125-135.
18. Wood, B., R. Washino, L. Beck, K. Hibbard, M. Pitcairn, D. Roberts, E. Rejmankova, J. Paris, C. Hacker, J. Salute, P. Sebesta, and L. Legters. 1991. Distinguishing high and low anopheline-producing rice fields using remote sensing and GIS technologies. Preventive Veterinary Medicine 11(3-4) : 277-288.

Applications of Geographic Information System (GIS) and Global Positioning System (GPS) on Pest Management

Jung-Tai Chao[1] and Chin-Hong Sun[2]

[1]·Division of Forest Protection, Taiwan Forestry Research Institute

[2]·Department of Geography, National Taiwan University

Abstract

Geographic Information System(GIS) is a computer software system (often including hardware) with which spatial information may be captured, stored, analyzed, displayed and retrieved. GIS has been applied for detecting pest infestation and early stages of insect outbreaks at regional or national scale. GIS also makes it possible to quantify and evaluate relationships among pest distribution, phenological factors, climatic variables, topographic attributes, crop mortality and economic loss. Through the help of GIS, land managers will be able to decide an acceptable response prior to the arrival of the inevitable damage caused by various pests. The Global Positioning System(GPS) provides full-time and fast ground coordinates data within meters of accuracy by receiving signals from earth-orbiting satellites. GPS has been used to record latitude-longitude coordinate data of infested localities. Precise location data obtained from GPS fit nicely into GIS and this, combined with other multiple data sets, allows a more accurate monitoring of pest dynamics. This paper introduces principles and functions of GIS and GPS and discusses different applications of GIS and GPS on pest management.

Key words: GIS, GPS, pest management.

「植物保護新科技研討會」專刊
臺灣省農業試驗所特刊第57號 pp. 11-22 (1996)

害蟲鑑定新技術: 生化、電腦及聲波分析技術之應用

楊 曼 妙

國立自然科學博物館蒐藏研究組

摘要：近年來由於生物技術及電腦等科技的快速發展，加以系統分類學理論的演進，昆蟲分類學及系統發生學的研究，普遍的應用新技術，以多方面的特徵配合傳統的形態方法來探討問題，間接的也提供害蟲鑑定技術的新展望。本文從生化(包括同功異構酶電泳分離技術、免疫方法、染色體分析、核酸變異分析及表皮碳氫化合物分析等)、電腦及聲波分析三方面，介紹這些技術在昆蟲鑑定上之應用，其適用範圍、優缺點及在害蟲鑑定的應用實例。

關鍵詞：害蟲鑑定、生化、電腦、聲波分析。

前 言

所謂鑑定(identification)是指將一生物個體歸屬到已建立的分類系統中之某一類群。鑑定的過程通常是用演繹法(deductive method)，根據檢索表(key)中的少數關鍵特徵來判別[28]。也因此很明顯的，鑑定技術的基礎必須建立在良好的分類系統之上。除此之外，害蟲的鑑定更需要準確、快速、簡便以及低成本。因爲害蟲的鑑定往往牽涉到經濟利益的問題，例如面對一批受昆蟲感染的進口貨物是否讓其通關，抑或一種田間受害作物是否應立即做防治處理，均有賴於準確的害蟲鑑定；而快速的決定往往可以減低產品在等待決策過程中所造成的損失；加以決策者如海關人員等往往需要同時面對多類害蟲，不可能如分類專家般精通某一類群生物之分類，因此簡便易操作的鑑定方法是必要的；此外，害蟲鑑定的需求往往是經常性的，而且通常是普遍的需求，因此發展低成本的鑑定方法是有其必要性的。

由於現有的一般昆蟲分類体系以成蟲或蟲體發育的某一階段之形態爲主，因此直接以肉眼或光學顯微鏡做傳統的形態比對是最常使用的鑑定方法。這種方式可以解決一般問題，但在某些狀況則需要尋求其他技術的支援，通常有下列兩種情形：一是形態相近不易區分的近緣類群，需要利用其他的生物特性，如生態、生理及生化等方面的特徵；二是形態雖可區分，但手續繁複且仰賴專家著手，爲要求效率及客觀性，發展如電腦自動鑑定等系統。

本文從生化(包括同功異構酶電泳分離技術、免疫方法、染色體分析、核酸變異分析及表皮碳氫化合物分析等)、電腦及聲波分析三方面，介紹這些技術在昆蟲鑑定上之應用。由於害蟲鑑定過程中往往涉及偵測害蟲存在與否，而針對某類害蟲所發展的偵測系統可以輔助鑑定，二者有相輔之效，在本文裡並未做明顯的區分。此外，因爲涵蓋範圍極廣而準備匆促，又限於時間難以週全，僅扼要針對每一項目探討其適用範圍、優缺點及列舉數個害蟲鑑定的應用實例。

生化技術之應用

昆蟲表皮碳氫化合物 (Cuticular hydrocarbon)：

利用氣相色層分析法 (gas chromatography，GC) 分析昆蟲表皮碳氫化合物的分類方法，近年來有許多應用的例子，尤其在近緣種及同胞種 (sibling species)之區辨[1]。

昆蟲爲外骨骼動物，其表皮碳氫化合物主要功能爲調節與保護，即防止水份散失，抵禦外來化學物質或微生物的侵入，在某些種類還進一步扮演訊息傳遞的功能，如發散費洛蒙(pheromone)等。這些特性已證實與遺傳有關，爲基因型的表現[23]，同時具有一定的穩定性，可做爲分類的依據[18]。此法的優點是不破壞標本外形，死活標本均可用，有助於博物館蒐藏品之利用[30]。然其缺點是需要基本設備及訓練，不易在野外進行，且其變異度依不同種類或同種之不同齡期(甚至日齡)，在GC色譜圖的質與量上或有差異[11]，應用時需很謹慎瞭解其變異。

著名的瘧疾病媒蚊蟲 *Anopheles gambiae* complex 中之 *A. gambiae* 及 *A. arabiensis* 形態相仿且經常同域存在(sympatric)，二者即在碳氫化合物色譜圖之C25-C29 有別[9]。熱帶家蚊之美國Riverside品系與印度Ghazi Abad品系之碳氫化合物色譜圖在雌雄上均有所別[11]，顯示此技術亦可運用於偵測不同之地理品系。而形態難分的德國蟑螂(*Blattella germanica*)與亞洲蟑螂(*Blattella asahinai*)雖在表皮碳氫化合物分析上只呈現定量(quantitative)差異，無定性(qualitative)區別，但可清楚區分此二種，甚至其雜交種。此二近緣種與同屬親緣較遠之 *B. vaga* 則有清楚的定性差異[8]。

昆蟲表皮碳氫化合物的進一步說明與實例可參考陳[1]在病媒昆蟲分類之應用的綜合論述。

染色體分析 (Chromosomal analysis)

使用染色體特徵分類的方法由來已久，至今仍被使用。其優點是基本設備簡單，是一種只要使用許多研究室原已具備的顯微鏡，即可探知染色體分子的方法[34]。然而其缺點是材料限於蟲體的某一階段，並且仰賴好的操作技術。使用的染色體特徵，除了數目與形態以外，近年來分子生物技術的發展也提供了染色體研究的新特徵，進一步做染色體上band的比較，如C-banding、G-banding 及FISH (fluorescence *in situ* hybridization)等詳細分析，使特定核酸序列在染色體的位置可以辨視出。

應用染色體探討分類及演化的例子，於雙翅目最爲普遍，在果蠅的研究上更有悠久的歷史，著名的夏威夷果蠅(Hawaiian *Drosophila*，參見Carson and Yoon [10])即爲一例，在此則以澳洲鬥牛犬蟻(Australian bulldog ant, *Myrmecia*)之研究爲例[24]，說明染色體分析的各種方法在此類螞蟻分類及演化上探討之應用。*Myrmecia pilosula* 事實上爲一複合種(species complex)，在1950年代一直被螞蟻分類學家認爲是同一種，只是形態稍有變異。Imai 等學者[24]近年來在其染色體演化方面的研究顯示，其種間染色體核型有極大的變異度存在(2n=2-32)，其中至少包含五個染色體數目完全不同的種，即 *M. croslandi* (2n=2-4)， *M. imaii* (2n=6-8)， *M. banksi* (the greenhead bulldog ant，2n= 9-10)， *M. haskinsorum* (2n= 12-24) 及 *M. pilosula* (the blackhead bulldog ant, 2n=18-32)。由C-banding的分析證實，在田間發現 *M. banksi* 與 *M. pilosula* 的色彩中間型個體，是此二種的雜交後代。Hirai 等[21] 更進一步使用FISH 探測 *Myrmecia* 五個種的DNA在染色體上的位置，發現在

C-bands上，並探討其染色體高變異度情形的演化，結果支持分裂(fission)的假說，較不支持結合(fusion)的假說。

同功異構酶或異位酶電泳 (Isozyme or allozyme electrophoresis)

電泳技術可謂是分子層次的研究中，最具低成本而高效益的方法，此爲其自1950年代早已發展而至今仍被廣泛使用在研究分類、遺傳、演化與生態等方面的原因之一[29]。在族群遺傳學上更於1960至1980年代期間盛極一時，蔚爲風尙，幾乎是將能發現的生物都拿來研磨跑電泳，因此有"發現與研磨學派" ("find 'em and grind'em" school) 之稱呼[25]。

電泳(electrophoresis)是利用電場的影響使蛋白質分離的方法。分析的蛋白質之各成份因爲分子的大小及荷電量的不同，受到選用的緩衝液種類、酸鹼值、膠片的孔隙大小及電場的强弱等影響，使其在電泳膠片上移動距離的遠近形成差異。利用不同的染色法即可使分開的泳動帶(band)呈色，藉以看出此類酵素的基因變異。通常檢視的蛋白質爲同功異構酶(isozyme)或異位酶(allozyme)。所謂同功異構酶乃指一群作用於相同基質(substrate)而分子結構不同之酵素。異位酶則是在同一基因座(locus)上的不同對偶基因(allele)所形成的酵素系統。此法的缺點是分析時標本必須是新鮮的(即活的或剛死的)或是保存於超低溫冷凍的新鮮標本。

應用電泳分類以輔助形態特徵之不足的例子不勝枚舉，尤其在形態不易分辨的複合種等情形，這類例子在許多古老而形態演化保守的分類群尤易發現[38]，相關資料可參見Richardson *et al.*[31]及 Murphy *et al.*[29]。

免疫分析(Immunoassay)

由於生物體內的抗體(antibody)會與外來的蛋白質(抗原，antigen)結合(binding)，產生免疫反應，其反應結果依抗體對抗原的親似性(affinity)與專一性(specificity)而不同，可以使用多種直接或間接的方法測定。在"蛋白質的親緣越近，其免疫反應越强"的假設前題之下，兩種不同生物間親緣的遠近，即可依其反應的强弱辨認。然而值得注意的是，反應結果的强弱也可能受到方法精確度的影響[27]。

目前免疫技術在植物病原菌的偵測鑑定與診斷似乎發展得比昆蟲方面爲快，相關原理與資訊可以參考本刊陳等[2]及張[3]的描述，此處不再重複。有趣的是利用免疫技術鑑定昆蟲的例子，在昆蟲生態學研究中已有四十年的歷史[7]，主要用於鑑定捕食性生物(如蜘蛛)消化器官內的昆蟲種類，藉以瞭解捕食者與被捕食者間的關係。其方法從早期較不敏感但便宜的tube precipitin test[15]，到醫學臨床的一些技術，如passive hemagglutination inhibition、radioimmunoassay與ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 等已多所應用，尤其是最後一項。Stuart & Greenstone[37]更提出immunodot assay的方法，比ELISA更爲敏感、快速及便宜，而最重要的優點是它不像ELISA需仰賴spectrophotometric reader的判讀，並且正負反應很明確。其實驗的材料是刺益椿(spined soldier bug, *Podisus maculiventris,* Pentatomidae)與狼蛛(jumping spider，*Phidippus audax*，Salticidae)胃中的玉米穗蟲(*Heliothis zea*，Noctuidae)。

此法的缺點是預備試驗繁複而昂貴，且如前項技術般，材料必須是新鮮的或是保存於超低溫冷凍的標本。然而，應用此類相關方法在害蟲鑑定上應有很好的發展，其專一特性提供很大的發展空間，不僅可以進行活蟲之偵測，甚或昆蟲遺體或殘骸亦可測知。例如Schatzki 等人[33]以肌球蛋白(myosin) ELISA方法偵測小麥穀物中是否有穀象(*Sitophilus granarius*)存在。且若發展良好，

可以研發田間可用的測試套具(kit)，達到準確、快速又簡便的效果。

以核酸爲基礎的分子生物技術 (DNA-based method)

以核酸(DNA)爲基礎的分子生物技術，在近年來普遍被應用到各方面的研究。受到歡迎的原因無異是它直接探索生物遺傳藍圖的最簡單化學形式。它的另外優點是核酸具耐久性與穩定性，不因齡期或環境而不同，使得材料除了新鮮的或冷凍的標本外，還可以是保存於酒精中或已經乾燥的，甚至可從化石中提析。因此提供了符合準確、便宜與易操作等條件的發展潛力。此方法以往最主要的缺點是需要用放射性同位素標記，近年來已發展出非放射性標記的方法，不過仍限於少數的酵素。

目前的各種技術主要仰賴核酸探針(DNA probe)或核酸聚合酵素聯鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)兩大類，而進行方法可分直接(direct)與逢機(random)兩種，例如以PCR爲基礎採用逢機方法者最常用的是任意引子核酸複製聯鎖反應增幅法(random amplified polymorphic DNA, RAPD)。此法於1990年始發展但廣受應用[4]，主要是其僅用任意的一條引子(primer)進行PCR反應，不需事先取得該基因組的資料，且僅需要少量的DNA，操作又簡單。Wilkerson *et al.*[41]的研究以此法鑑定瘧疾病媒蚊蟲*Anophelis gambiae s.s.*與 *A. arabiensis*，發現有七個引子具有判別性的特徵。*Anophelis gambiae* complex 的成員含有六個形態極爲相近的姊妹種，其中多種(如 *A. gambiae*及 *A. arabiensis*)惡名昭彰，爲非洲地區傳染瘧疾的主要病媒，許多研究單位投資大量人力與物力，嘗試以各種方法區辨傳病與不傳病的種類，以期達到有效的防治。利物浦熱帶醫學院(Liverpool School of Tropical Medicine)乃其中之一，Crampton及其同儕[19,20]致力於篩選每種瘧蚊內具有專一性的一段DNA，利用此探針鑑定病媒害蟲，提供是或否的絕對性答案。目前他們已發展出可以在野外測定*Anopheles gambiae* complex的簡單、敏感而準確的DNA探針，並且即將推出昆蟲史上第一套商品化的昆蟲鑑定套具(insect identification kit)。此法將提供理想而簡便的偵測，只是每一受測蚊蟲可能得經過一系列的探針測試，方可取得最後的答案。

Hill and Crampton[19] 就以核酸爲基礎的技術在病媒昆蟲鑑定的綜論一文中，針對核酸探針或核酸聚合酵素聯鎖反應兩方法和前述染色體及電泳方法做一成本評估，顯示前兩種較新發展技術的成本並不比後二者爲高(表一)。不過值得注意的是，其估算並不包含先期試驗，而此部份通常在核酸技術上花費極大，因此在詮釋其比較結果時需極謹慎。

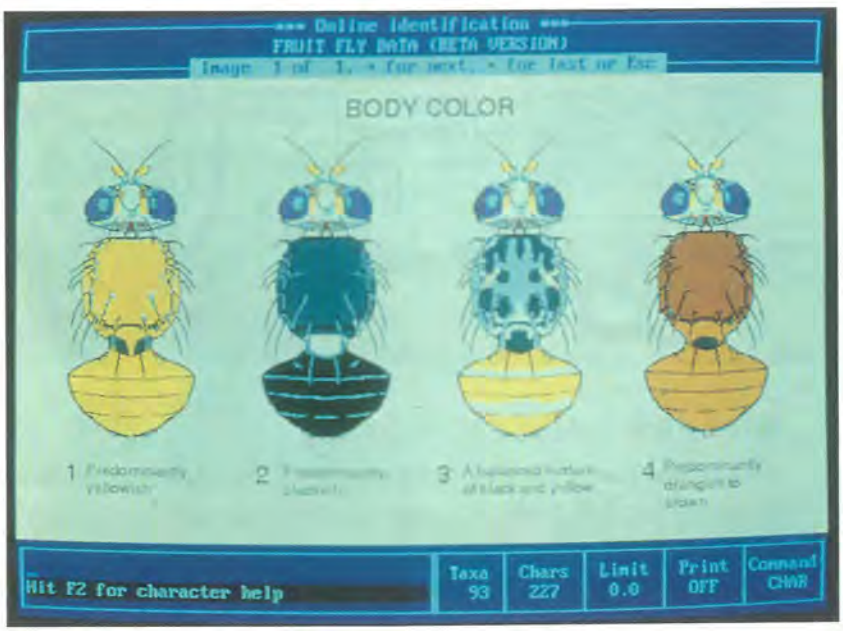
表一、鑑定瘧疾病媒蚊蟲 *Anopheles gambiae* complex 的四種方法之比較

Table 1. Comparison of four techniques for the identification of *Anopheles gambiae* complex mosquitoes[19]

Parameter	Chromosome	Isozymes	PCR	DNA probes
Costs per specimen (US$)	0.10	1.00-1.58	1.45	0.06-0.12
Capital equipment (US$)	9,000	12,300	12,800	basic lab equipment
No. specimen/person/day	30	40	40	200
Preservative	Carnoy's	Liquid N_2	Isopropanol	Any
Specimen requirement	Half gravid female or 4th instar larvae	Female or male	Any stage	Any stage
Accuracy (%)	100	95	100?	100?
Period of training required	3 months	6 weeks	1 week	1 week

電腦技術之應用

資訊電腦化是現代的普遍趨勢，昆蟲分類的研究亦不例外。尤其是在處理龐大的昆蟲種類資料時，電腦的快速處理能力及對所收集資料空間的節省上，無疑的提供了良好的解決的途徑。由於電腦設備的普及化，更使得所建立的資訊可以廣泛流傳與利用。許多國家的研究機構紛紛成立專案建立生物資料庫。例如由荷蘭政府、阿姆斯特丹大學及聯合國共同支助的非營利組織－分類鑑定專家中心(Expertise Center for Taxonomic Identification, ETI) 即針對分類專家的日益減少，以及這方面資訊的可及性的降低，於1991年成立了此一中心，其目標爲運用現代電腦科技，集中、保存並傳佈分類知識，以達到快速與有效的解答分類、生物地理與生態方面的問題[32]。ETI首先進行的類群有鳥類與原生動物等，將以CD-Rom 及網路線上作業方式提供使用。另外以昆蟲資料庫爲主的則有由美國農業部系統分類研究室提出的陸生節肢生物系統分類資料庫(Biosystematic Information on Terrestrial Arthropods, BIOTA)，目標在建立分類命名資料庫，收錄世界上所有已知昆蟲之目錄，也將以CD-Rom 及網路線上作業方式提供使用。BIOTA初期建立的資料將以北美昆蟲爲主，目前Allen Norrbom完成了長達571頁的北美果實蠅 (Tephritidae)手冊，以此爲依據，美國農業部系統分類研究室的Christian Thompson 、Lynn Carroll 與Norrbom 加上英國及以色列的專家共同合作，在長達五年的工作之後，如今即將推出電腦化的果實蠅專家系統測試版[14] Thompson，個人通訊)，其中繪圖及描述了 190種具經濟重要性的果實蠅，將有助於海關檢疫人員快速的鑑別害蟲，儘速決定是否讓檢疫商品通關，以減低經濟損失[6](圖一)。在俄國則有已發展二十年歷史而於最近更新版本的BIKEY電腦輔助鑑定系統[26]，以多選擇檢索的方式取代傳統的單項檢索，並有圖表及文字說明輔助使用。此程式具有快速的鑑定效率，可應用於植物保護與檢疫工作上。

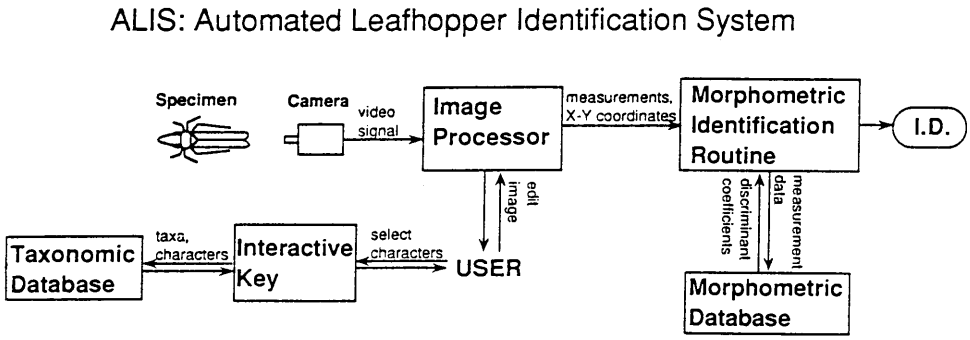


圖一、電腦化的果實蠅專家系統顯示的選項螢幕之一。

Fig. 1. One of the screens displayed choices by the Fruit Fly Identification System. (Courtesy of C. Thompson)

在國內則有蔡與齊[5]建立的甘蔗害蟲專家系統SCanPest。所謂專家系統(expert system)是指以電腦模擬人腦智慧的思考方式(或稱人工智慧)，針對特定的專門領域所建立的系統。隨著人工智慧的熱烈發展及電腦科技的日新月異，專家系統也自1980年代起廣泛的被應用到病蟲害防治方面[12,22,36]。SCanPest以選擇性的目錄諮詢使用者，容許肯定(是或否)或不確定的答案，除提供害蟲資料檢索及害蟲種類鑑定的服務外，還有建立新資料及修改已有之資料庫內容的能力，頗具彈性及發展的空間，是國內此方面發展的很好起步。

使用電腦進行昆蟲鑑定的另一類例子爲Dietrich 及Pooley[13] 針對 *Draeculacephala* 屬浮塵子發展的自動鑑定系統(automated leafhopper identification system, ALIS)。只要將欲鑑定的標本置於解剖顯微鏡下，其所連接的影像分析儀與設定好的電腦程式將會呈列標本特徵與圖供使用者選擇，在重複的交流篩選下，直至剩一個種或一個種群，若爲後者則需進入形態測量系統，調整標本與抓取影像後將進行自動鑑定程序(圖二)。*Draeculacephala* 屬中多數種可以使用定性的非連續性特徵來分別，Dietrich 等建立了26種18個外形特徵的矩陣區辨之。但其中有兩個種群(species group)無法直接由外形來判斷，需要以雄性生殖器及腹部內骨分辨。Dietrich 等以形態測量的方式取代解剖比對的繁複手續，用定量特徵分析之，可達89-98%的準確度，其中最低的限於 *D. antica* group 的兩種極不易分的雌蟲。此一系統的缺點是設備成本較高，即使假設電腦目前極爲普遍，大部份的實驗室具備足夠處理這些資訊的電腦硬體，仍需要另外投資影像分析設備。而此一系統將來的展望是完全自動化，即當使用者將一欲鑑定的標本擺好角度置於解剖顯微鏡下，影像進入電腦後，不需使用者在過程中回答檢索的問題，能自動進行定性或定量分析，最後給予正確的答案。



圖二、浮塵子自動鑑定系統的主要步驟流程圖。

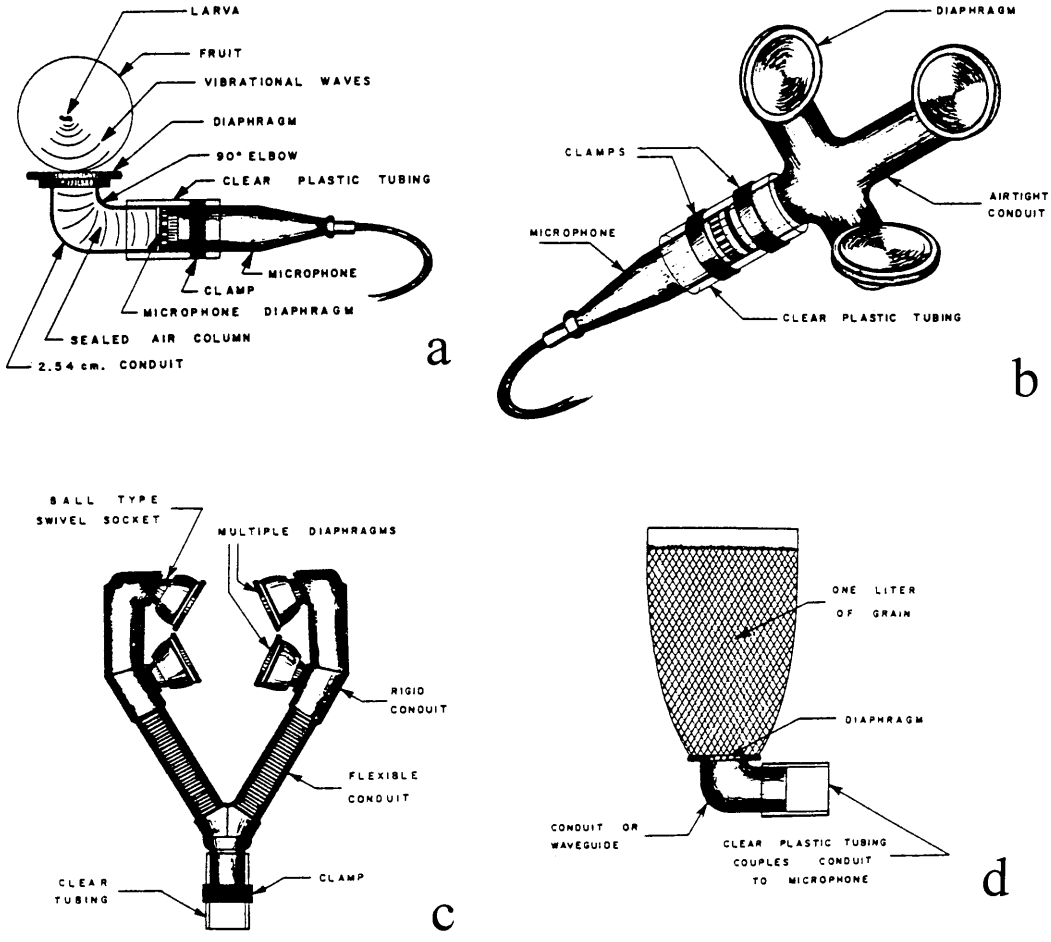
Fig. 2. Interactions among the major components of the automated leafhopper identification system.[13]

聲波分析技術之應用

聲音在許多類的昆蟲是傳遞訊息的重要方式，利用昆蟲發出的聲音來分辨種類、輔助形態分類的例子，在直翅目及同翅目尤多。通常這些聲音對昆蟲本身具有特殊的意義，如求偶、警戒、

辨認同巢伙伴等。但昆蟲也可能發出一些沒有特殊意義的聲音，如咀嚼或行走所發出的噪音。這些聲音或許不容易應用於種類鑑定，但可能幫助我們達到偵測其存在的依據。

Webb等人[39,40]在佛州的美國農部研究站即利用果實蠅幼蟲等取食所發出的聲音來判別是否有害蟲在水果等農產品中，以作爲檢疫之判斷。他們依不同農產品形狀發展出可將其握住或承裝的偵測器材，稱作聲音連結器(acoustical coupler，圖三)，只要將欲偵測的水果或穀物放置其上，若有害蟲取食，經過放大器即可將噪音傳遞至聲波分析儀及耳機。此法檢驗農產品中的害蟲，不僅免於剖開水果所造成的產品損失，且其敏感度高，甚至可以偵測出果實蠅的初齡幼蟲，這種微小而透明的蟲體通常不易於解剖顯微鏡下找出。



圖三、四種聲音連結器，即偵測害蟲存在與否的器材，爲握著或承裝不同形狀的農產品而設計。(a)用於圓形水果(如葡萄柚)的單臂裝置；(b)用於圓形水果如柳橙的三臂裝置；(c)用於不規則形水果(如木瓜及芒果等)的設計；(d)用於承載測試的儲存穀物之設計。

Fig. 3. Four acoustic couplers designed for different shaped agricultural products. (a) a single-arm design for spherical fruit such as grapefruit; (b) a three-arm design for round fruit such as citrus; (c) for irregular shaped fruit such as papaya and mango; (d) for stored grain. (provided by J. C. Webb, USDA-ARS Insect Attractants, Behavior, and Basic Biology Research Laboratory, Gainesville, FL)

Webb的同一研究室近年改善其偵測穀物害蟲的方法，發展出另一套以壓電感應器(piezoelectric sensor)替代麥克風，更敏感、更便宜的系統，並且連接電腦，可以自動偵測出包括穀物間及通常不易偵測到的穀物內害蟲，其所在位置及密度[35]。此外，若將感應器裝置在穀物的儲藏處，可以作長期的自動偵測，而不需要自倉儲中取出穀物查視情形，對於配合市場需求的變動及瞭解穀物品質狀態，決定何者需儘早銷售或處理，有很大的幫助[16,17]。

至於蛀木昆蟲發出的聲音也被應用於偵測其存在與否以及種類之判定，並且在多年前已商品化。美國科羅拉多州一家公司出品Insecta-Scope偵測器，猶如醫生用的聽筒般，將之貼到木屋牆壁等要偵測的木頭上，可由連接的耳機直接來監聽。

結語及未來展望

以上各種方法的優缺點比較是相對的，不是絕對的。最重要的是每一方法有其特性，必須依種類、需要與目的來選擇適用的。而文中多處將分類、鑑定與偵測相提並論，並未清楚的釐定界線，主要是因爲這些方法在鑑定上的應用並非都已成熟，而分類提供鑑定的基礎，偵測亦免不了涉及鑑定。例如前面介紹的聲波分析方法主要是偵測害蟲是否存在，並非以鑑定爲目標。但偵測前若對該種害蟲聲音的特性不瞭解，則無法確定測得的聲音是否來自欲偵測的害蟲。如此情況下，害蟲的偵測實際上涵蓋鑑定的程序。

害蟲鑑定技術仍有待長足的研究與發展，而其目前最大的限制來自於基本分類資料的不全。所幸現階段已有數個以建立完整分類資料庫爲目標的計畫在進行當中，然而此類計畫仍以整理現有分類資料爲主，實際上許多昆蟲的分類體系極待重新修訂，需要更多人的投入與努力。

醫學界早就想以免疫方法在五分鐘內測出是否感染愛滋病(見Newsweek, July 25, 1988, p.51)，我們希望將來在害蟲鑑定上能發展出更快速、簡便而準確的鑑定方法，雖然這種研發是需要很大的投資，但相對於一些嚴重而常發生的害蟲所造成的影響，還是值得發展的。在這個科技整合的時代，不僅是生化、電腦以及聲波分析等已發展技術，期望有更多好的新技術應用在昆蟲的鑑定。

謝　辭

感謝美國農業部(USDA)蜜蜂研究室(Bee Research Laboratory)的洪章夫博士，在準備演講前提供許多資訊與幻燈片，文成之後又幫忙審稿，給予諸多寶貴的意見。此外，USDA 昆蟲誘引物、行爲及基礎生物學研究室(Insect Attractants, Behavior, and Basic Biology Research Laboratory)的 J. C. Webb 及R. Mankin提供聲波檢測資訊與慷慨允諾使用圖片；USDA 昆蟲系統分類學研究室(Systematic Entomology Laboratory)的 Chris Thompson 亦提供電腦鑑定方面的圖片與資訊；臺大植病系研究生楊肖欽、商品檢驗局許明達、中興大學齊心教授亦提供部份資料，在此一併致謝。

參考文獻

1. 陳錦生 1991 表皮碳氫化合物在病媒昆蟲分類之應用。中華昆蟲特刊第六號 第四屆病媒防治技術研討會論文集 第34-47頁。

2. 陳隆鐘、余瑞卿、賴學珍、王志宏 1996 近代生物技術在病原眞菌偵測及診斷之應用。農試所特刊 57:23-34。
3. 張清安 1996 植物病毒鑑定及診斷新技術。農試所特刊 57:35-45。
4. 鄭可大、陳志輝、周昌弘 1993 Random Amplified Polymorphic DNA 在生態學上的應用。生物科學 36(2): 1-8.
5. 蔡忻旼、齊心 1991 SCanPest: 甘蔗害蟲專家系統。植保會刊 33: 149-166。
6. Becker, H. 1994. Insect I.D.'s now at your fingertips. Agricultural Research (ARS, USDA), May, pp. 16- 18.
7. Boreham, P. F. L. and C. E. Ohiagu. 1978. The use of serology in evaluating invertebrate prey-predator relationships: a review. Bull. Entomol. Res. 68:171-194.
8. Carlson, D. A. and R. J. Brenner. 1988. Hydrocarbon-based discrimination of three North American *Blattella* cockroach species (Orthoptera: Blattellidae) using gas chromatography. Ann. Entomol. Soc. Amer. 81: 711-723.
9. Carlson, D. A. and M. W. Service. 1979. Differentiation between species of the *Anopheles gambiae* species complex (Diptera: Culicidae) by analysis of cuticular hydrocarbons. Ann. Trop. Med. Parasitol. 73: 589-592.
10. Carson, H. L. and J. S. Yoon. 1982. Genetics and evolutionof Hawaiian *Drosophila. in* Ashburner, M., H. L. Carson and J. N. Thompson, Jr. [eds.] The genetics and biology of *Drosophila,* 36: 298-344.
11. Chen, C. S., M. S. Mulla, R. B. March, and J. D. Chaney. 1990. Cuticular hydrocarbon patterns in *Culex quinquefasciatus* as influenced by age, sex, and geography. Bull. Soc. Vector Ecol., 15(2): 129-139.
12. Coulson, R. N. and Saunders, M. C. 1987. Computer-assisted decision-making as applied to Entomology. Ann. Rev. Entomol. 32: 415-437.
13. Dietrich, C. H. and C. D. Pooley. 1994. Automated identification of leafhoppers (Homoptera: Cicadellidae: *Draeculacephala* Ball). Ann. Entomol. Soc. Am. 87(4): 412-423.
14. Entomological Society of America. 1994. Worldwide insect database on the horizon. ESA Newsletter, 17(5): 1
15. Greenstone, M. H. 1979. Passive hemagglutination inhibition: a powerful new tool for field studies of entomophagous predators. Misc. Pubs. Entomol. Soc. Amer. 11: 69-78.
16. Hagstrum, D. W. and D. Shuman. 1995. Automatic sample inspection and in-bin monitoring of stored-grain insects using acoustical sensors. pp. 207-209. *in* Krischik, V., G. Cuperus, and D. Galliart [ed.] Stored product management. Cooperative extension service, USDA and Oklahoma State University.
17. Hagstrum, D. W. , P. W. Flinn, and D. Shuman. 1995. Acoustical monitoring of stored-grain insects: an automated system. *in* Highley, E. *et al.* [ed.] Stored product protection. Proceedings of the 6th International Working Conference on Stored Product Protection. April 1994, Canberra, Australia.
18. Hamilton, R. J. and M. W. Service. 1983. Value of cuticular and internal hydrocarbons for the

identification of larvae of *Anopheles gambiae* Giles, *Anopheles arabiensis* Patton and *Anopheles melas* Theobald. Ann. Trop. Med. Parasitol. 77: 203-210.

19. Hill, S. M. and J. M. Crampton. 1994. DNA-based methods for the identification of insect vectors. Ann. Trop. Med. and Parasitol. 88(3): 227-250.
20. Hill, S. M., R. Urwin, and J. M. Crampton. 1992. A simplified, non-radioactive DNA probe protocol for the field identification of insect vector specimens. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 86: 213-215.
21. Hirai, H., M.-T. Yamamoto, K. Ogura, Y. Satta, M. Yamada, R. W. Taylor, and H. T. Imai. 1994. Multiplication of 28S rDNA and NOR activity in chromosome evolution among ants of the *Myrmecia pilosula* species complex. Chromosoma, 103: 171-178.
22. Holt, J., J. A. Cheng, and G. A.Norton. 1990. A systems analysis approach to brown planthopper control on rice in Zhejiang Province, China. III. An expert system for making recommendations. J. Appl. Ecol. 27: 113-122.
23. Howard, R. W. and G. J. Blomquist. 1982. Chemical ecology and biochemistry of insect hydrocarbons. Ann. Rev. Entomol. 27: 149-172.
24. Imai, H. T., R. W. Taylor, and R. H. Crozier. 1994. Experimental bases for the minimum interaction theory. I. Chromosome evolution in ants of the *Myrmecia pilosula* species complex (Hymenoptera: Formicidae: Myrmeciinae). Jpn. J. Genet. 69: 137-182.
25. Lewontin, R. C. 1991. Twenty-five years ago in genetics: Electrophoresis in the development of evolutionary genetics: Milestone or millstone? Genetics, 128: 657-662.
26. Lobanov, A. L. and M. B. Dianov. The BIKEY interactive computer identification system and its use in Entomology. Entomol. Rev., 74(6):41-53.
27. Maxson, L. R. and R. D. Maxson. 1990. Proteins II:Immunological techniques (Chapter 5). pp.127-155. in Hillis, D. M. and C. Moritz. [eds.] Molecular systematics. Sinauer. 588pp.
28. Mayr, E. 1982. The growth of biological thought. Diversity, evolution and ingeritance. p.147. Harvard Univ. Press. Mass.
29. Murphy, R. W., J. W. Sites, Jr., D. G. Buth, and C. H. Haufler. 1990. Proteins I: Isozyme electrophoresie (Chapter 4). pp. 45-126. in Hillis, D. M. and C. Moritz. [eds.] Molecular systematics. Sinauer. 588pp.
30. Phillips, A., R. Crosskey, A. Shelley, G. Broomfield, and D. H. Molyneux. 1986. Cuticular hydrocarbon analysis of museum Simuliidae. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 80: 844.
31. Richardson, B. J., P. R. Baverstock and M. Adams. 1986. Allozyme electrophoresis. A handbook for animal systematics and population studies. 410pp. Academic Press.
32. Schalk, P. H. 1992. Systematics goes multimedia: computerizing biological knowledge. ASC News letter, 20(3):117-119.
33. Schatzki, T. F., E. K. Wilson, G. B. Kitto, P. Behrens, and I. Heller. 1993. Determination of hidden *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) in wheat by myosin ELISA. J. Econ. Entomol. 86 (5): 1584-1589.

34. Sessions, S. K. 1990. Chromosomes: Molecular cytogenetics (Chapter 6). pp.156-203. *in* Hillis, D. M. and C. Moritz. [eds.] Molecular systematics. Sinauer. 588pp.

35. Shuman, D., J. A. Coffelt, and K. W. Vick. 1993. Quantitative acoustical detection of larvae feeding inside kernels of grain. J. Econ. Entomol. 86(3):933-938.

36. Stone, N. D., R. N. Coulson, R. E. Frisbie, and D. K. Loh. 1986. Expert systems in Entomology: three approaches to problem solving. Bull. Entomol. Soc. Amer. 32(3): 161-166.

37. Stuart, M. K. and M. H. Greenstone. 1990. Beyond ELISA: A rapid, sensitive, specific immunodot assay for identification of predator stomach contents. Ann. Entomol. Soc. Am. 83(6): 1101-1107.

38. Wake, D. B. and A. Larson. 1987. Multidimensional analysis of an evolving lineage. Science, 238: 42-48.

39. Webb, J. C. , C. A. Litzkow, and D. C. Slaughter. 1988a. A computerized acoustical larval detection system. Appl. engin. agric. 4(3):268-274.

40. Webb, J. C. , D. C. Slaughter and C. A. Litzkow. 1988b. Acoustical system to detect larvae in infested commodities. Florida Entomologist, 71(4): 492-504.

41. Wilkerson, R. C., T. J. Parsons, D. G. Albright, T. A. Klein, and M. J. Braun. 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers readily distinguish cryptic mosquito species (Diptera: Culicidae: *Anopheles*). Insect Molecular Bio. 1: 205-211.

New Techniques in Pest Identification: the Application of Biochemical, Computer, and Acoustic Analysis

Man-Miao Yang
Division of Collection and Research, National Museum of Natural Science

Abstract

The fast development in biotechnology and computer in recent decades provides many effective new approaches in systematics. It also casts the light of new techniques in pest indentification. In this paper, the application of biochemical, computer, and acoustic analyses is discussed. The biochemical approaches reviewed include cuticular hydrocarbons, chromosomal analysis, isozyme or allozyme electrophoresis, immunoassay, and DNA-based method.

Key words: pest identification, biochemical, computer, acoustic analysis.

「植物保護新科技研討會」專刊
臺灣省農業試驗所特刊第57號 pp. 23-34 (1996)

近代生物技術在植物病原眞菌偵測及診斷之應用

陳隆鐘 余瑞卿 賴學珍 王志宏
國立中興大學植物病理學系所

摘要：植物檢疫與植物防疫是未來植物保護的工作重點之一。而植物病原眞菌之偵測鑑定與診斷技術將是植物檢疫與植物防疫的工作一環。免疫技術(immunological techniques)及核酸技術(nucleic acid techniques)進行植物病原眞菌偵測、診斷與鑑定爲一較新技術。血清技術常利用的方法計以多株抗體、單株抗體爲反應基質進行偵測(polyclonal and monoclonal antibodies as reagents)、酵素連結免疫吸附測定分析法(enzyme-linked immunosorbent assay)、免疫螢光及免疫金蛋白標識測定分析(immunofluorescence and immunogold labeling)、核酸技術包括核酸探針(nucleic acid probes）製作，及以偵測診斷爲主之核酸探針雜合反應 (nucleic acid hybridization based detection techniques)、點雜配分析(dot-blot hybridization assay)、限制酵素輿圖多型性分析(restriction fragment length polymorphisms analysis)、DNA 聚合酵素連鎖反應增幅法(DNA polymerase chain reaction)、任意引子 DNA 聚合酵素連鎖反應增幅法(random amplified polymorphic DNA -RAPD)、去氧核醣核酸指紋分析法(DNA fingerprinting)等技術。近年來，由於爲使形態相近的不同菌株(種)，或同種不同亞種及生理小種的菌株能夠提供便利的鑑別技術，於是利用粒線體核酸之多複本(high copy number)特性與不同菌株間皆會有特殊的差異加以應用核酸限制酵素切割片段多型性(RFLP)分析種間及種內差異性及菌株之間粒線體核酸多型性及變異性，更進一步由粒線體核酸選殖技術篩選出與田間菌株皆可產生交互作用的專一性核酸探針，以期能應用在田間病害之偵測。目前在菌株(種)快速鑑別與類緣關係的研究探討上，以任意引子 DNA 聚合酵素連鎖反應技術(RAPD)及 DNA 聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction，PCR) 爲快速靈敏且可大量應用於實際偵測診斷應用上。目前爲止，新技術之應用使植物病原眞菌之偵測、診斷與鑑定進入了新里程碑，其實際應用層面及輔助分類鑑定診斷與偵測將是另一值得開發的新科技。

關鍵詞：生物技術、植物病原眞菌、偵測、診斷。

前 言

早期有相當多學者利用蛋白質電泳圖譜，同功異構酵素分析，進行植物病原眞菌菌系系統(phylogenetic)之間的親緣關係的探討。但由於眞核生物DNA核酸序列中具有許多introns，經轉錄後並不能表現於mRNA上；即不能形成特定或重要蛋白質產物，因此藉由蛋白質產物分析菌系關係上較形困難。近年來，由於近代生物技術(modern biotechnology)的進步，所以技術被廣泛應用在植物病原眞菌之偵測、診斷與鑑定，而使植物病原眞菌之分類與偵測、檢定更具客觀性。

隨著全世界農產品貿易自由化的潮流影響，農產品的輸出入等將益形增加複雜化。因此，植

物檢疫與植物防疫將是未來植物保護的工作重點之一，而植物病原眞菌之偵測、鑑定與診斷技術即將是植物檢疫與植物防疫的工作中極爲重要的一環。如此一來，可以少用農用化學品將使產量、品質等損失減少而達到良好之植物保護。也由於快速偵測診斷生物技術的發展使植物育種學家可快速在植物體內確定或操作重要基因，而植物病理學家也可以利用新的偵測診斷技術發現植物病原菌在植物組織內的存在及感染位置，而更能快速、精確與敏感的偵測，以利病原微生物與植物組織間之關係的瞭解，進一步更可以瞭解病原性基因的起源及其調控。

1987年在歐洲召開有關於血清技術(單株抗體)及DNA探針技術知識與經驗的會議，接著，1990年在蘇格蘭，共同集結專家學者進行快速偵測技術研討會議。由於這二次會議，加速近代生物技術在植物病原微生物快速偵測的腳步。目前，近代生物技術利用於植物病源眞菌偵測診斷技術者包括免疫血清技術與核酸技術。免疫血清技術研究過程中，目前須進一步克服其廣泛使用性、適用性與操作性的瓶頸。如何取得較專一性的融合瘤技術乃是較具重要的研究開發重點。

核酸偵測技術的發展日新月異，其中包括核酸探針的製作及以偵測診斷爲主之核酸探針雜合反應、點漬雜配分析、限制酵素切割片段輿圖分析、DNA聚合酵素連鎖反應增幅法、任意引子DNA 聚合酵素連鎖反應增幅法、去氧核醣核酸指紋分析法等技術。而這些技術已廣泛應用於植物病原眞菌致病基因、相同菌株(種)內不同生理小種的鑑定以及田間實際病害偵測等方面之應用。近來由於PCR技術的進步，目前在菌株(種)快速鑑別與親緣關係的研究探討上，以任意引子DNA聚合酵素連鎖反應技術(RAPD)及DNA聚合酵素連鎖反應(PCR)爲快速靈敏且可大量應用於實際偵測診斷應用上，隨著生物科技的進步，快速偵測技術將會有成功的一日。本文將以免疫技術、核酸技術分別介紹其在植物病原眞菌偵測、診斷與應用可行性之探討。

血清技術在植物病原眞菌偵測及診斷之應用

利用血清技術進行植物體內外之病原眞菌偵測

在自然界中，有相當多的重要植物病原眞菌性病害，尤其是危害莖部之土傳性病害，在診斷上頗爲困難。但如果早期傳染時便能診斷出來，則對病害防治具有相當大的幫助。如果能發展出快速診斷技術將可減少作物損失及不必要之藥劑噴灑。一般而言，免疫血清技術具有快速、敏感及專一性高的特性，可偵測由植物病原眞菌所造成的病害，也同時依研究目的，如植物病原眞菌流行病偵測之研究、及植物病原眞菌定性定量研究、診斷鑑定等。

但利用血清診斷技術以及單株抗體技術 (MAbs) 偵測感染植物之病原眞菌專一性所需時間較長。相反的，利用上述技術偵測植物病毒卻是較爲進步且快速，其主要原因之一；因大部分病原眞菌可以利用光學顯微鏡檢查其菌絲構造或有性與無性器官，因此可以用此來鑑別眞菌。第二個理由乃因植物病原眞菌生活史複雜、有性無性生殖器官繁多，其免疫診斷技術研發過程中較難獲得專一性抗血清。如由眞菌胞子或菌絲片段、培養過濾液、可溶性抽出液所製備之抗血清，當利用於免疫擴散法偵測可得到較具專一性結果，但如果用免疫螢光技術 (IF) 偵測或酵素連結免疫吸附測定分析法(ELISA)可能會得到較不具專一性之結果[9,10]。像此類之抗血清可廣泛分析相關屬種與寄主分子發生交互反應[9,10,26]。Barker & Pitt (1988) 從受炭疽病菌(*Collectotrichum* spp.)感染秋海棠球莖中製備出對炭疽病菌具專一性之多株抗體抗血清，後來又有許多學者一直期待增加其專一性，但是其反應力價反而降低[6]。有一些研究者企圖稀釋非專一性抗體，或者利用血清白

蛋白(bovine serum albumin (BSA))中止一些非專一性反應，如此一來以競爭型偵測交互反應即可減少許多問題[33]。但是如果以同科、同屬、同種等生理小種或菌株所獲得之多株抗體或濃縮的抗血清去進行免疫擴散(immunodiffusion)、免疫電泳(immunoelectrophresis)或免疫點漬法(electroblot immunoassay)常導致失敗[9,10,15]。

目前偵測診斷用之單株抗體(monoclonal antibodies)研發進展

一般而言，要獲得眞菌專一性之單株抗體，須藉由融合瘤技術[34]。係利用融合瘤細胞培養技術進行具專一性抗體之骨髓瘤細胞與 lymphocytes 結合，因此如果要從眞菌培養過程中之過濾液來獲得單專一性之單株抗體是一件非常困難的事。截至目前爲止，僅有部分從感染植物之眞菌獲得單株抗體的例子成功，Ianelli 等人擬以單株抗體(MAbs)區分 *Fusarium oxysporum* 的 form species (f. sp)爲第一個研究單株抗體應用於植物病原眞菌偵測診斷之例子[28]。Banowetz 等人利用單株抗體技術只能偵測小麥的 wheat bunt fungi 中的二個種(species)的冬孢子。以診斷植物病原眞菌爲目的之單株抗體(MAbs)的製備是有相當程度的困難性，但在區別或診斷 *Phytophthora cinnamomi*[26]，*Phytophthora megasperma* var. *glycinea*[59] 及 *Pythium aphanidermatum*[18] 開發種與種之間或種專一性之單株抗體，已很清楚指出其間尚有極大發展潛力。但是由 Hardhaw *et al.*, 及Estrada-Garcia 等人所獲得之單株抗體僅能以 *Pythium* 及 *Phytophthora* 屬所產生之游走子(zoospores)進行測試，而以感染之植物或土壤進行偵測則比較有效[19]。Wong 等人利用免疫螢光技術(IF)成功進行香蕉萎凋病菌(*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*)之具厚壁厚膜胞子 race 4 及 race 1分析[59]，Deway 等人製作出荷蘭榆樹病(Dutch elm disease)菌 *Ophiostoma* (*Ceratocystis*) *ulmi* 及穀物之眼點病(the eye-spot)菌 *Pseudocercosporella* 及水稻儲藏之穀粒惡化病原眞菌 *Hamicola lanuginosa* 及 *Penicillium islandicum* 等竿株抗體，因此其潛力無窮[18,19]。

核酸技術在植物病原菌偵測及診斷上之應用

近年來，由於生物技術(biotechnology)的進步，於是很多專家學者開始嘗試使用細胞遺傳(cytogenetic)，生化層次(biochemical)及其他的分子特性，於眞菌偵測、診斷與分類研究上，而使眞菌偵測、診斷、分類更具客觀性。若從 DNA上著手研究菌系系統之間的關係，則會有較完整的序列存在。一般來說，眞菌的粒腺體核酸(mtDNA)分子量較小，較易作爲研究樣本以便進一步分析並了解其特性。

眞菌粒腺體核酸的特性：

眞菌的粒腺體核酸(mtDNA)除了少數爲直線形外(slime mold, *Physarum ephalpolycum, Hansenula mrakii*)，大都爲雙螺旋環狀分子。其粒腺體核酸的分子量大小大約從18.9 kbp (*Torulopsis glabrata*) 到176kbp (*Agaricus bitorquis*)。所以，其眞菌粒腺體核酸分子量大小的差異可運用在偵測、診斷與分類上，如 *Schizophyllum* spp.[50,51]. *Ustilago* spp.[56]. Oomycetes[33]. *Coprinus* spp.[55] 菌之粒線體核酸之研究。Schildkraut 等人發現細菌、眞菌、動物及噬菌體的DNA與CsCl成線性函數之特定比例存在，隨即Villa和Storck 藉由14種眞菌之研究發現：nuclear DNA (nDNA)與 mitochondria DNA(mtDNA)在氯化銫梯度密度(CsCl density gradient)達一定平衡時，可將之個別分離出來，而且粒腺體核酸在其全核酸(total DNA)中所佔的量非常少，一般而言，其粒腺體核酸

的G+C含量百分比會低於染色體核酸,或有些的粒腺體核酸之G+C含量百分比會接近於染色體核酸，依此特性，所以可在含有螢光染劑4,-6-diamidine-2-phenylindole(DAPI)或bisbenzimide之情況下，以氯化銫梯度離心將粒腺體，從全量核酸中分離而得[20,43]。並且，由於粒腺體核酸經熱失活之後回復的能力比染色體核酸來得穩定，再加上粒腺體核酸分子量較小，比較能夠做詳細解析，所以一般上來說，粒腺體核酸更適合於分子演化上的研究[53]。

眞菌粒腺體核酸探針之選殖與應用：

目前，藉著基因選殖的發展與進步，可自病原菌之基因體中選殖出具有特異性之核酸片段，以應用於植物病原菌上之鑑定與偵測，更進一步應用於病害之診斷。而粒腺體核酸探針製備乃是先將粒腺體核酸與適當的載體(vector)，經內限制酵素(restriction enzyme)消化後，再經由黏結酵素(ligase)進行黏結反應(ligation)，並轉形(transform)至容易增殖且方便篩選之菌株中，最後即可由獲得之轉形株(transformants)中篩選出攜帶有核酸片段之轉形株，並分離出崁入之核酸片段(insert)，再加以標識(labeling)成爲探針(probe)。由於核酸探針具有較穩定的偵測特性，且較血清探針擁有更精確而穩定的效果[39,41]，所以近年來核酸探針已被廣泛的應用在生物科學的領域上。而在植物病理學的研究上，基因選殖技術及核酸探針之研製也已廣泛地應用在致病基因的探討[40,49]，相近菌種及菌種內不同生理小種的鑑別[46]，如：*Sclerotinia* spp.[35]、*Fusarium* spp.[36]、*Fusarium melonis*[23]、*Peronosclerospora sacchari*[60]、*Gaeumannomyces graminis*[61]、*Verticillium dahliae*[44]，以及田間實際病害之偵測等方面[41]。而近來，由於爲了在形態相近的不同菌種、或同種不同亞種及生理小種的菌株，能夠提供便利的鑑別技術。於是利用粒腺體核酸爲多複本(high copy number)之核酸分子特性[8]與不同菌株間核酸序列中皆會有特殊的差異[39]，加以應用於核酸限制酵素輿圖多型性(Restriction fragment length polymorphisms, RFLP)分析種間及種內之差異性[36]及菌株之間粒腺體核酸的多型性及變異性[7]，更進一步由粒腺體核酸選殖之技術，篩選出與屬內菌種皆可產生交互作用的專一性探針，以期能應用在田間病害之偵測[41,46]。例如Martin和Kistler研究*Pythium* spp.粒腺體核酸之RFLPs，發現有些菌株種內之相似度在80% 以上，而菌株種間之相似度大多小於30% ，所以可以了解各菌種內的粒腺體核酸之傳承應相當穩定[38]；Martin以*Pythium oligandrum*粒腺體核酸經確認某一特異性之核酸片段後，將其作爲核酸探針，以區分*Pythium oligandrum*及*Pythium sylvaticum*[37]；Chen等人研究*Pythium* spp.種間之核糖體核酸的限制片段圖譜，發現種間大致上都相似，相對地，在其粒腺體核酸限制輿圖圖譜的相似度卻只有20% 。Stammler等人研究*Phytophthora fragariae* var. *fragariae*，運用粒腺體核酸基因選殖之際述及探針之研製，得到一個1.5kb的粒腺體核酸探針，配合RFLPs的方法，將可區分*Phytophthora fragariae* var. *fragariae*及*Phytophthora fragariae* var. *rubi*，且將此探針與其他*Phytophthora* spp.菌種進行核酸雜合反應，結果顯示同種內的菌株會呈現相似的圖譜，相對地，其種間的差異性則較大[52]。Goodwin等人亦針對*Phytophthora parasitica*之粒腺體核酸，選殖出具有高度專一性之核酸探針，並加以嘗試偵測土壤及感病植株中之病原菌[22]。Kistler等人研究由*Fusarium oxysporum*粒腺體核酸限制酵素片段圖譜，發現小種之間具有地域性的分岐現象[31]。Kim等人分析*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*粒腺體核酸之RFLPs，並選殖七段粒腺體核酸片段，進行混合探針與菌株之核酸雜合反應，並將此病原菌可區分爲六個RFLP群，此些群之間的相似性最高爲90%，最低爲65%[29]。此外，Kim等人又以相同的混合探針，針對*Fusarium*

*oxysporum*的五個亞種(formae speciales)之粒腺體核酸多型性分析研究，發現各亞種所呈現的圖譜不只一種，且有些亞種之間的相似性高於亞種之內的相似性[30]。所以，可將此病原菌各菌系之間作成系統樹，可作爲亞種之間演化上的一種依據。此外，重要病原眞菌中利用RFLP技術做菌系判別及類緣關係探討成功的例子尙有*Leptosphaeria korrae*[55]、*Armillaria mellea*[4]、*Sclerotinia* spp.[35]、*Fusarium* spp.[32]、*Phytophthora* spp.[19,22,33,46]。目前在菌種快速鑑別與類緣關係的研究探討上，另一快速且可應用於大量材料的技術是：Random amplified polymorphic DNA (RAPD)[56,57]及聚合酵素連鎖反應(polymerase chain reaction；PCR)[47]。PCR是應用在少量的DNA上，且必需要有特定的寡核甘酸引子(oligonucleotide primers) 才能增幅 (amplify) 少量的DNA，而RAPD則是應用在隨意利用一個小且短、任意設計的引子(arbitrarily-designed primer)達到增量少量的DNA，所以RAPD又稱爲Arbitrarily primed- PCR(AP- PCR)。此兩種方法皆具靈敏性，且可快速運用在大量的材料上。如：Punja 等人利用幾個常用增幅粒腺體DNA9(mtDNA)及核DNA(nuclearDNA)的引子，使用在*Sclerotium rolfsii*的全DNA上，利用12種不同的限制酵素分析PCR產物，再篩選出能夠有效區別不同寄主、地區及菌絲親合性群的有效引子，以進一步分析[27]。Quellet及Seifert 等人針對 *Fusarium graminearum* 菌株利用RAPD分析篩選出具有特異性且能應用於鑑別的片段，再利用解序(sequencing) 此具專一性的片段之後，以PCR 增量，使能運用在田間快速鑑別此病原菌之存在。Assigbetse等人以*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* 篩選出具致病性之RAPD markers，以期能鑑定此病原菌的病原性族群 (pathogenicity group) 及分類。此外，尙有一些利用此技術成功的例子，如應用在*Fusarium solani*[24]、*Colletotrichum graminicola*[25]、*Leptosphaeria maculans*[21]、*Gaeumannomyces graminis*[60]、*Neurospora crassa*[57] 等菌系之分類。所以目前爲止，針對植物病原眞菌的分類與鑑定上，此技術衍然已成爲一種新興且普遍的方法。爲了達到對病原菌做快速的偵測(detection)及診斷(diagnosis)的目的，製備菌株專一性的核酸探針配合點漬試驗(dot-blot assay)應爲較理想的方法。Sauer, K. M., 等人由*Ophiosphaerella herpotricha*的基因庫篩選到一個1.5kb的探針，利用點漬法測試29個*O. herpotricha*菌株和其他三十株眞菌及細菌的核酸與此核酸探針的反應，結果顯示此探針會很專一的與*O. herpotricha*菌株產生明顯的反應，此外將此核酸探針配合點漬法，可由200mg的染病植株根部萃取的核酸中偵測病原菌的存在，以點漬法測出此核酸探針(^{32}P 標識)的靈敏度可達到10pg核酸量，相當於1 μg 冷凍乾燥菌絲所具有的核酸量。由於點漬試驗法一次可篩檢許多樣本，將此法應用於病原菌的偵測實爲經濟、快速、且簡便的方法[48]。

本實驗室研究以白絹病菌粒腺體DNA進行數次轉型實驗，後篩選出重組質體804002-69、804002-14、804002-96、804002-28、804021-43、804021-67、804021-53、804021-29 和*Sclerotium rolfsii*、*Sclerotinia sclerotiorum* 及*Rhizoctonia solani* 之全量DNA進行點雜配(dot hybridization)反應。根據實驗結果比較分析，以探針804021-53 較具專一性。再以探針804021-53進行南方雜合實驗，白絹病菌菌株之總量核酸呈現相似的圖譜。由於粒腺體核酸探針能應用核酸分子特性[8]與不同菌株間核酸序列中皆會有特殊的差異，加以應用於核酸限制酵素切割片段多型性(Restriction fragment length polymorphisms, RFLP)分析種間及種內之差異性[39]及菌株之間粒腺體核酸的多型性及變異性[7]，篩選出與屬內菌種皆可產生交互作用的專一性探針，以期能有效地應用在田間病害之偵測上。所以未來的研究方向，將著重於RFLP分析種間及種內之差異性，對白絹病菌分類上亦有所貢獻。利用探針804021-53以點雜配法進行探針品質評估時，可有效偵測到菌株804027全

DNA濃度至10^{-6} μg，偵測探針804021-53粒腺體核酸片段時有效濃度爲10^{-7} μg。探針804021-53進行組織漬染偵測帶菌球莖，以點雜配法進行百合種球(白雪內、外鱗片，白狐狸內、外鱗片以及白雪、白狐狸種球外土壤萃取液)以點雜配法進行組織敏感性測定時，偵測有效濃度各爲10^{-5} μg、10^{-6} μg、10^{-6} μg、10^{-7} μg、10^{-7} μg、10^{-7} μg。由此可知，菌核在球莖鱗片上殘存之處(內鱗片及外鱗片中)皆有可能存在(1)。參考以上的研究，希望由粒腺體核酸選殖出具有專一性的探針，

表一、從感染植物之病原眞菌獲得之單株抗體

Table 1. Monoclonal antibodies raised against plant-invading fungi (Dewey, 1992)

Fungus	Nature	Immunogen (amount per injection)	Freund's adjuvan	Route early	Booster	Screening method	specificity	MAb class	Reference
Fusarium oxysporum f.sp. *lycopersici*	Spores	107	+	i.p.	i.p.	ELISA-spores	Genus	NGl	Ianelli *et al.* (1983)
Tilletia sp.	Spores Spore extracts	3 mg	-	i.p.	i.v.	ELISA-spores	NSG	IgM	Banowetz *et al.* (1984)
Phytophthora cinnamomi	Zoospores	2x107	-	i.p.	i.p.	IF-zoospores	NSG	NG	Hardhan *et al.* (1986)
Sirococcus strobilinus	Hyphal fragments	1 mg	+	i.p.	i.v.	ELSIA-sol. Ag NS Genus	IgM，IgG	Mitchell & Sutherland (1986)	
Glomus occultum	Spore	50000	-	i.p.	i.p.	ELISA-spores	Species	IgG	Wright *et al.* (1987)
Phytophthora megasperma f. sp. *glycinea*	Culture filtrate	0.15 mg protein	+	i.p.	NG	ELISA-sol.Ag Western blot	NSG	IgM,IgG,IgA	Wycoff *et al.* (1987)
Fusarium oxysporum f.sp.*cubense*	Conidia Hyphal fragments	8x07 40 mg	-			IF	NSG Race specific	IgM	Wong *et al.* (1988)
Armillaria mellea	Hyphal fragments	NG	+/-	i.p.	NG	ELISA-hyphal fragments	NSG	ND	Fox & Hahne (1989)
Ophiostoma ulmi	Hyphal fragments	3 mg	+	i.p.	i.v.	ELISA-sol.Ag	Species & genus	IgG，IgM	Dewey *et al.* (1989a)
Humicola lanuginosa	SW	150 mg protein	-	i.p.	i.p.	ELISA-SW	Genus*	IgM	Dewey *et al.* (1989b)
Penicillium islandicum	SW	500 mg protein	-	i.p.	i.p.	ELISA-SW	Species	IgG	Dewey *et al.* (1990)
Pythium	Zoospores	NG	NG	NG	NG	IF-zoospores	Zoospores & cysts,genus & species	NG	Callow *et al.* (1987) Estrada-Garcia *et al.* (1989)

將來能應用在田間病株之篩選，或由球根花卉上球莖鱗片中篩選出白絹病菌菌核殘存的位置，證明白絹病菌菌核是否會殘存於球根上，造成進口球根污染本土之栽培區。此專一性之探針亦可應用RFLP於白絹病菌菌株之分類與鑑定上，或與具有產生菌核的病原菌間之類源探討；進一步更可延伸於白絹病菌致病基因之研究上。

另外，本實驗室亦用限制酵素剪切露疫菌 PL024 菌株粒線體核酸，以 pUC18 載體黏合插入片段進行基因庫選殖，選殖到 4 個選殖株 A2-3、HC3、HC9及ES6。分別將其製備爲核酸探針再與 25 株露疫菌粒線體核酸以點漬測試進行雜合反應，結果都有雜合交互作用。另再利用 17 株 *Phytophthora* 菌株及 *Pythium splendens* 的全量核酸進行雜合反應，結果顯示 ES6 探針對露疫菌較具有專一性。另外這四個探針與 16 株 *Pythium* 菌株之總量核酸(total DNA)進行點漬分析，測試核酸探針的專一性，結果四個探針對這 16 株腐霉菌都有不同程度的訊號產生。經點漬測試，ES6 探針的靈敏度可測到 100 fg 濃度的露疫菌粒線體核酸[3]。除此之外，染色體外基因之利用亦是一重要研究課題，如眞菌質體狀去氧核醣核酸(plasmid-like DNAs)亦是獨立遺傳系統。因此其具有良好之遺傳穩定性。由本實驗室研究採集發現立枯絲核菌相同菌絲融合群間之菌株其質體狀DNA (plasmid-like DNAs) 具有相當高之同源性(homology)[2,11,12,13,14]。開發選殖質體狀DNA (plasmid-like DNAs) 爲某些病原眞菌之偵測診斷用核酸探針是可行之點。由於近代生物技術的進步，很多植物病原眞菌之生活史、生態特性、遺傳特性慢慢被瞭解後，除將可加速植物病原性眞菌致病基因的探討外，更可幫助眾人進行快速生態偵測及診斷檢疫等利用，實爲未來重要研究方向與課題。

參考文獻

1. 余瑞卿。1995。白絹病菌生理特性及其核酸探針製備與分析。國立中興大學植物病理學研究所碩士論文，台中，96 頁。
2. 廖家德。1994。台灣立枯絲核菌(*Rhizoctonia solani* Kuhn) 第四融合群菌株質體狀去氧核醣核酸的歧異性及其核酸定序。國立中興大學植物病理學研究所碩士論文，台中，63 頁。
3. 賴學珍。1995。露疫菌粒線體核酸探針的選殖與分析。國立中興大學植物病理學研究所碩士論文，台中，73 頁。
4. Anderson, J. B., Petsche, D. M., and Smith, M. L. 1987. Restriction fragment polymorphisms in biological species of *Armillaria mellea.* Mycologia. 79:69-76.
5. Banowetz G. M., Trione E. J., and Smith J. M. B. 1984. Immunological comparisons of teliospores of two wheat bunt fungi, Tilletia species using momoclonal antibodies and antisera. Mycologia 76: 51-62
6. Barker, I., and Pitt, D. 1988. Detection of the leaf curl pathogen of anemones in corms by enzymeimmunosorbent assay (ELISA). Plant Pathology 37; 417-22.
7. Beckmann, J.S., and Soller, M. 1983. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement methodologies, mapping and cost. Theor. Appl. Genet. 67:35-43.
8. Bruns, T. D., Palmer, J. D., Shumard, D. S., Grossman, L. I., and Hudspeth, M. E. S. 1988. Mitochondrial DNAs of *Suillus* : three fold size change in molecules that share a common gene order. Curr. Genet. 13:49-56.

9. Chard, J. M., Gray, T. R. G., and Frankland, J. C. 1985a. Purification of an antigen characterisitic for *Mycena galopus.* Trans. Brit. mycol. Soc. 84:463-466.
10. Chard, J. M., Gray, T. R. G., and Frankland, J. C. 1985b. Use of an anti-Mycena galopus serum as an immunofluorescent reagent. Trans. Brit. mycol. Soc. 84: 235-241.
11. Chen, L. C., Miyasaka, A., Miyashita, S., Ehara, Y., and Hashiba, T. 1992. Genetic relatedness of plasmid-like DNA in isolates from anastomosis group 4 of *Rhizoctonia sola*ni. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn 58: 286-291.
12. Chen, L. C., and Liao, J. T. 1993. Comparative studies on plasmid-like DNAs from some important crops in Taiwan. 6th International Congress of Plant Pathology P.156 (abstract)
13. Chen, L. C., and Liao, J. T. 1994. Studies on the presence of plasmid- like DNAs among *Rhizoctonia* spp. isolated from some important crops in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 3:316-323.
14. Dewey, F. M., and Brasier, C. M. 1988. Development of ELISA for *Ophiostoma ulmi* using antigen coated wells. Plant Pathology 37: 28- 35.
15. Dewey, F. M., Munday, C. J., and Brasier, C. M. 1989a. Monoclonal antibodies to specifie components of the Dutch Elm Disease pathogen *Ophiosioma ulm.* Plant Pathology 38: 9-20.
16. Dewey, F. M., MacDonald, M. M., and Pillips, S. I. 1989b. Development of monoclonal antibody -ELISA, -dot-blot and -dip-stick immunnoassays for *Humicola lanuginosa* in rice. J. Gen. Microbiol. ?135: 361- 374.
17. Dewey, F. M., MacDonald, M. M., Pillips, S. I., and Priestley. 1990. Development of monoclonal antibody-ELISA and -dip-stick immunnoassays for *Penicillium islandicum* in rice grains. J. Gen., Microbio. 136: 753-760.
18. Estrada-Garcia, M. T., Green, J. R., Booth, J. M., White, G., and Callow, J. A. 1989. Monoclonal antibodies to cell surface components of zoospores and cysts of the fungus *Pythium aphanidermatum* reveal species-specific antigens. Exp. Mycolo. 13:348-356.
19. Forster, H., Kinscherf, T. G., Leony, S. A., and Maxwell, D. P. 1989. Restricction fragment length polymorphisms of the mitochondrial DNA of *Phytophthora megasperma* isolated from soybean, alfalfa and fruit trees. Can. J. Bot. 67:529-537.
20. Garber, R. C., and Yoder, O. C. 1983. Isolation of DNA from filamentous fungi and separation into nuclear, mitochondria, ribosomal, and plasmid components. Anal. Biochem. 135:416-422
21. Goodwin, P. H., and Annis, S. L. 1991. Rapid identification of genetic variation and pathotype of *Leptosphaeria maculans* by random amplified polymorphic DNA assay. Appl. Environ. Microbiol. 57: 2482-2486.
22. Goodwin, P. H., Kirkapatrick, B. C., and Duniway, J. M. 1989. Cloned DNA probes for identification of *Phytophthora parasitica.* Phytopathology 79:716-721.
23. Gordon, W\T. R., and Okamoto, D. 1992. Variation in mitochondrial DNA as an indicator of relationships between populations of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis.* Mycol. Res. 94:734-744.
24. Growhuret, R. N., Hawthorne, B.T., Rikkerink, E. H. A., and Templeton, M. D. 1991. Differentiation of *Fusarium solani* f.sp. *curcurbitae* races 1 and 2 by random amplified polymorphic DNA.

Curr. Genet. 20:391-396.

25. Guthrie, P. A. I., Magill, C. W., Frederiksen, R. A., and Odvody, G. N. 1992. Random amplified polymorphic DNA markers: A system for identifying and differentiating isolates of *Collectotrichum graminicola.* Phytopathology 82:832-835.
26. Hardham, A. R., Suzaki, E., and Perkin, J. L. 1986. Monoclonal antibodies to isolate-species and genus-specific components on the surface of zoospores and cysts of the fungus *Phytophthora cinnamomi.* Can. J. Bot. 64:311-21.
27. Harlton, C. E., Levesque, C. A., and Punja, Z. K. 1995. Genetic diversity in *Sclerotium* (Athelia) *rolfsii* and related species. Phytopathology. 85:1269-1281.
28. Ianelli, D., Caparelli, R., Mariziano, F., Scala, F., and Noviello, C. 1983. Production of hybridoma secreting monoclonal antibodies to the genus *Fusarium.* Mycotaxon 17:523-532.
29. Kim, D. H., Martin, R. D., and Magill, C. W. 1992. Restriction fragment length polymorphism groups and physical map of mitochondrial DNA from *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum.* Phytopathology 82:346- 356.
30. Kim, D. H., Martin, R. D., and Magill, C. W. 1993. Mitochondrial DNA (mt DNA) relatedness among formae speciales of *Fusarium oxysporum* in the curcurbitaceae. Phytopathology 83:91-97.
31. Kistler, H.C., Bosland, P.W., Benny, U., Leong, S., and Williams, P. H. 1987. Relatedness of strains of *Fusarium oxysporum* from cruwfers measured by examination of mitochondrial and ribosomal DNA. Phytopathology 77:1289-1293.
32. Kitagawa, T., Sakamoto, Y., Furumi, K., and Ogwra, H. 1983. Novel enzyme immunoassays for specific detection of various *Fusarium* species. Phytopathology 79:162-165.
33. Klassen, G. R., McNabb, S. A., and Dick, M. W. 1987. Comparison of physical maps of ribosomal DNA repeating units in *Pythium, Phytophthora* and *Apodachlya.* J. Gen. Microbiol. 133:2953-2959.
34. Kohler, g., and Milstein, C. 1975. Countinous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256:595-597.
35. Kohn, L. M., Petsche, D. M., Bailey, S. R., Novak, L. A., and Anderson, J. B. 1988. Restriction fragment length polymorphosms in nuclear and mitochondrial DNA of *Sclerotinia* species. Phytopathology 78: 1047-1051.
36. Manicom, B. O., Bar-Joseph, M., Rosmer, A., Vigodsky-Hass, H., and Kotze, J. M. 1987. Potential application of random DNA probes and restriction fragment length polymorphisms in the taxonomy of the *Fusaria.* Phytopathology. 77:669-672.
37. Martin, F. N. 1991. Selection of DNA probes for isolate identification of two *Pythium* spp. Phytopathology 81:742:746.
38. Martin, F. N., and Kistler, H. C. 1990. Species specific banding patterns of restriction endonuclease digested mitochondrial DNA from the genus *Pythium.* Exp. Mycol. 14:32-46.
39. Michelmore, R. W., and Hulbert, S. H. 1987. Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. Annu. Rev. Phytopathol. 25:383-404.

40. Michelmore, R. W., Kesseli, R. V., Francis, D. M., Fortin, M. G., Paran, I., and Yang, C. H. 1992. Strategies for cloning plant disease resistance genes. Molecular Plant Pathology: a practical approach. 2:234-288. (Gurr, S. J., Mepherson, M. J. and Bowles, D. J.)
41. Miller, S. A., and Mastin, R. R. 1988. Molecular diagnosis of plant disease. Annu. Rev. Phytopathol. 26:967-970.
42. Miyasaka, A., Chen, L. C., and Hashiba, T. 1990. Detection and properties of plasmid-like DNA in isolates from nine anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani.* J. Gen. Microbiol. ?136: 1791-1798.
43. Muller, W., and Gautier, F. 1975. Interactions of heteroaromatic compounds with nucleic acids (A-T- specific non-intercalacting DNA ligands). Eur. J. Biochem. 54:385-394.
44. Okoli, C. A. N., Carder, J. H., and Barbara, D. J. 1993. Molecular variation and sub-specific groupings within *Verticillium dahliae.* Mycol. Res. 97:233-239.
45. Panabieres, F., Marais, A., Trentin, F., Bonnet, P., and Ricci, P. 1989. Repetitive DNA polymorphisms analysis as a tool for identifying *Phytophthora.* Phytopathology 79:1105-1109.
46. Prenger, J., and Martin, F. N. 1993. Mapping and crosshybridization of mitochondrial DNA from several species of *Pythium.* Phytopathology 83:1423 (abstract).
47. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplication of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239:487-491.
48. Sauer, K. M., Hulbert, S. H., and Tisserat, N. A. 1993. Identification of *Ophiospaerella herpotricha* by cloned DNA probes. Phytopathology 83:97-102.
49. Sock, J., Rohringer, R., and Kolmer, J. A. 1994. Mitochondrial DNA of *Puccinia graminis* f. sp. *avenae:* Molecular cloning, restriction map and copy number. Phytopathology 84:49-55.
50. Specht, C. A., Novotny, C. P., and Ullrich, R. C. 1983. Isolation and characterization of mitochondrial DNA from the basidiomycetes *Schizophyllum commune.* Exp. Mycol. 7:336-343
51. Specht, C. A., Novotny, C. P., and Ullrich, R. C. 1992. Mitochondrial DNA of *Schizophyllum commune* restriction map, genetic map and model of in heritance. Curr. Genet. 22:129-134.
52. Stammler, G., Seemuller, E., and Duncan, J. M. 1993. Analysis of RFLPs in nuclear and mitochondrial DNA and the taxomy of *Phytophthora fragariae.* Mycol. Res. 97:150-156.
53. Taylor, J. W. 1986. Fungal evolutionary biology and mitochondrial DNA. Exp. Mycol. 10:259-269.
54. Tisserate, N. A., Hulbert, S. H., and Nus, A. 1991. Identification of *Leptosphaeria korrae* by cloned DNA probes. Phytopathology 81:917- 921.
55. Weber, C. A., Hudspeth, M. E. S., Moone, G. P., and Grossman, L. I. 1986. Analysis of the mitochondrial and nuclear genomes of two basidiomycetes, *Coprinus violacea* and *Coprinus stercorarius.* Curr. Genet. 10:515-525.
56. Welsh, J., and McCelelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 18:7213-7218.
57. Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., and Tingey, S. V. 1990. DNA

polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18: 6531-6535.

58. Wong, W. C., White, M., and Wright, I. G. 1988. Production of monoclonal antibodies to *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 4. Letters in Applied Microbiology 6:39-42.
59. Wycoff, K. L., Jellison, J., and Ayers, A. R. 1987. Monoclonal antibodies to glyco-protein antigens of a fungal plant pathogen, *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea.* Plant Physiology 85:508-515.
60. Yao, C.L., Magill, C.W., Frederisksen, R. A., Bonde, M. R., Wang, Y., and Wu, P. S. 1991. Detection and identification of *Gaeumanomyces graminis* var. *tritici* and *G. graminis* var. *avenae* using a DNA probe and non-molecular methods. Mycol. Res. 96:737- 742.

Application of modern biotechnology on the detection and diagnosis of plant pathogenic fungi

L. C. Chen, R. C. Yu, S. C. Lai and J. H. Wong
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University

Abstract

Plant quarantine Plays an important role in the development of plant protection. Detection and diagnosis of plant pathogenic fungi is one of the major work of plant quarantine. Immunological techniques and nucleic acid techniques have been remarkable progress in the development of new techniques for detection and diagnosis of plant pathogenic fungi. Immunological techniques include polyclonal and monoclonal antibodies as reagents, enzyme-linked immunosorbent assay, immunofloresrescence and immunogold labeling, and nucleic acid techniques include nucleic acid hybridization based detection techniques, dot-blot hybridization assay, restriction fragment length polymorphisms analysis, DNA polymerase chain reaction, random amplified, DNA-RAPP, DNA fingerprinting. The last 5-10 years have been remarkable progress in the development of new techniques for convenient identification of different isolates of similar morphology and physiological races, by using polymorphisms and variation of mitochondrial DNA, and further cloning of specific DNA probes for the detection and diagnosis of plant pathogenic fungi. At present, random amplified polymorphic DNA and polymerase chain reaction are the most speedy and sensitive methods for practical application on the detection and diagnosis of plantpathogenic fungi. Since now, new biotechnology have been progress for the detection and diagnosis, and further development of new technology for the identification, diagnosis and detection of plant pathogenic fungi.

Key words: Biotechniques, detection, diagnosis, plant pathogenic fungi.

「植物保護新科技研討會」專刊
臺灣省農業試驗所特刊第57號 pp. 35-45 (1996)

植物病毒鑑定及診斷新技術

張 清 安
臺灣省農業試驗所

摘要：植物病毒病很難以傳統之病徵診斷方式加以判別乃眾所皆知之事實。因此病毒病的診斷與病毒種類之鑑定通常需仰賴較特殊之技術才能達成。隨著科技的日新月異，病毒病的診斷與鑑定技術也不斷的推陳出新。本文除就近年來廣爲應用之病毒診斷與鑑定技術做一綜合整理外，也將最近開發成功逐漸受到重視的技術加以簡要介紹以餉讀者。最早被應用爲植物病毒診斷與鑑定之技術爲生物檢定法，此法源自1929年Holmes發現將TMV接種到煙草*Nicotiana glutinosa*時可產生局部壞死斑點，此後利用適當的指示植物接種便一直被應用爲主要的病毒鑑定方法。但是受多項因素之影響，生物檢定法於近十年來逐漸式微。1939年由於電子顯微鏡的發明，使得以觀察感病植物體內的病毒顆粒爲直接之鑑定依據成爲可能。但因電顯之精細與昂貴造價，卻也阻礙了此項技術之全面普及。50年代末期科學家開始利用抗血清檢定法進行病毒病的鑑定與診斷。由於此法具有快速、簡單、敏感與正確的各項優點，至今仍爲病毒診斷與鑑定的主要技術。由於科技的進步，血清檢定法由最早期的沈澱法開始，不斷地被科學家改良成爲各式各樣適合不同狀況使用的方法。其中較值得一題的是免疫擴散法(immunodiffusion)，免疫電顯法(SSEM)，免疫點漬法(immunoblotting)，組織壓片法(tissue printing)，螢光免疫法(immunofluorescence)，ELISA，RIPA及西方轉漬法(western blotting)等。早期的抗血清反應只有利用抗體與抗原(即病毒)二者反應後所產生的沈澱物有無來加以判斷。自從1977年ELISA發展出來以後抗原與抗體的反應可以透過與抗體先行聯結的酵素或其他標識物質如放射物質，螢光物質或化學光物質而將反應的訊號加以擴增。此類訊號可以透過訊號接收機加以記錄並可進行定量與定性分析，因此現階段的抗血清檢定法之敏感度與實用性更形提高，成爲病毒診斷與鑑定方法的主力。除了利用抗體所進行之診斷方法以外，近十年來由於遺傳工程生物技術之快速發展，病毒診斷與鑑定也逐漸步入核酸鑑定時代。例如核酸探針(DNA probe)檢定技術就是其中之一種。此法乃利用與病毒核酸互補的一段核酸片斷做爲試劑使其與供測病毒核酸發生雜配(hybribization)反應，其反應之結果以放射性或非放射性物質加以偵測出來。利用核酸探針偵測病毒的敏感度顯著高於抗血清檢定法。不過由於前者供測之標本通常需經繁複的核酸抽取工作，較之簡單易行的抗血清檢定法，其未來的普及性仍有待觀察。爾後1987年Kary Mullis發明了核酸片斷複製聯鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)，此法可將一目標核酸片斷加以重複複製，因此在短時間內即可將其擴增至可偵測的濃度。其敏感度高出現階段所有的病毒檢定法甚多，不過由於此法使用時必需對欲偵測之核酸序列有所了解才能設計出適當引子(primer)供檢測之用，因此全面使用仍有所限制，而且由於試驗所需之酵素甚貴可能也會限制其全面普及。總之利用病毒核酸爲偵測目標的診斷方法可預測地將會繼續不斷地被開發出來，許多過去認爲不可行的目標，在可見的未來將會陸續被突破，希望日後病毒診斷與鑑定工作將不再是一項繁複而困難的工作。

關鍵詞：病毒、植物病毒、診斷、鑑定。

前 言

病毒侵入寄主植物體後通常會形成不可回復之感染關係(irreversible infection)[6, 26]。感染後之植物體大部份細胞內均會有病毒顆粒存在，此種系統性的感染程序常會導致寄主植物之生長勢(vigor)，產量(yield)及品質(quality)受到不定程度之影響。由於目前仍無法以藥劑之處理復原感染病毒植株，而只能以消極之預防方法，防止進一步之傳染而避免危害擴大。因此病毒病之正確診斷及病毒種類之鑑定以了解其傳播方式，便成爲控制病毒病害之先決條件[23]。在早期，植物病毒病害之診斷通常是仰賴病徵之判別來進行[6, 23]。然而隨著研究人員經驗之累積，已發現病徵診斷之不可靠性。因爲植物感染病毒後並不一定會顯現肉眼可資辨視之徵狀，而且有很多因環境不適，微量元素缺乏或過量，其他微生物感染，甚至昆蟲危害等因素也可能造成類似病毒病的徵狀。因此爲了正確診斷病毒病之感染，不能只依靠病徵之判斷，而最好能利用更敏感與專一之方法進行檢定才能加以確認[18]。如果要進一步鑑定感染病毒之種類作爲防治之參考，則更無法以病徵之差異作爲判別之依據。因爲不同病毒常會造成類似之病徵，而同一病毒由於環境或寄主品系之差異也會造成絕然不同之徵狀[18, 19]。因此發展其他較具專一性之鑑別方法已成爲近年來病毒學研究之一項重點。目前可用於診斷病毒病之方法非常多，有經驗之研究人員可以依據不同狀況之需求選擇適合的方法來應用，但對於初入門的工作人員而言，面對雜陳於文獻上之各種方法則常會無所適從。此種狀況會導致部份人士過度追求新奇，因而捨近求遠，去簡追繁，反而造成事倍功半或徒勞無功甚至造成錯誤判別而茲事體大。一般而言，用來診斷病毒病之方法依其功能可分爲二大類，其中一類較適合病毒之檢定，可精確的判斷出檢體中病毒之有無，但其結果較不適合作爲判別病毒種類之依據。反之，有些技術則適合專供鑑別病毒種類之用，然而因步驟繁瑣，無法做爲大量樣品之檢查方法。總之，不同之病毒檢查技術均各有其優缺點與限制，研究者必需依據不同狀況與需求選擇適當的技術加以應用。因此對於對於各項技術應了解掌握其特性，方能於面臨不同需求之狀況下知所選擇。以下筆者將就近年來廣爲應用之病毒診斷與鑑定技術做一綜合整理，另外也就最近開發成功逐漸受到重視的技術加以簡要介紹供研究同好參考使用。

病毒病之鑑定及診斷技術

生物檢定法

生物檢定法是最早被應用於植物病毒診斷與鑑定之方法[6, 23]。此法源自1929年Holmes 發現以機械摩擦方式將菸草嵌紋病毒(TMV)接種到煙草 (*Nicotiana glutinosa*) 葉片上，可產生局部壞死斑點。此後利用適當的指示植物接種，便一直被應用爲主要的病毒鑑定方法[6, 23]。此乃利用病毒在不同寄主上造成判別性病徵之特性，以人爲方式將未知病毒接種到鑑別性寄主(differential hosts)上，視其產生之反應與已知病毒對照後加以鑑定。但是影響接種成功與否及接種後病徵之表現的因素太多，此法所得結果常無法作爲充分之鑑定證據。加上許多病毒之人工接種十分困難，或病徵之表現耗費時日，或鑑別性寄主植物難求，或栽培費時費工，均使得生物檢定法之效率與正確性受到頗多質疑，因此此法於近十年來已逐漸式微。不過由於生物檢定之專一性與敏感性仍爲目前許多常用技術所不及，因此在病毒之分類與鑑別程序上生物檢定結果仍爲必須列爲參考之標準之一。

電子顯微鏡觀察法

1939年電子顯微鏡發明成功後，使直接觀察感病植物體內的病毒顆粒作爲鑑定依據成爲可能[10]。但是對於顆粒形態大且容易辨視之病毒而言，利用電顯觀察判別病株簡單易行。然而對於小型病毒而言，由於在電顯下不易與寄主之成分如核醣體區別，並不適合用電顯觀察法進行檢定。而且很多因素如採樣數少，病毒濃度不均及人爲操作經驗等都有可能影響觀察之結果。故常有觀察之結果看不到病毒顆粒，卻無法斷言該樣本確屬健全植物之窘境。何況電子顯微鏡造價昂貴必須專人負責操作，也是此項檢定方法難以普及化之主要原因。因此電子顯微鏡觀察法較不適合作爲病毒檢定之依據。然而此法卻是現階段所有病毒診斷方法中唯一能夠解讀病毒顆粒型態及大小者，故仍被視爲提供鑑別及分類病毒種類依據之必要方法[10]。除了觀察病毒顆粒型態外，電顯也可被用來觀察經過超薄切片之罹病組織細胞之病理變化，尤其對於病毒感染後所形成之內含體或病毒聚合體之構造亦爲鑑別病毒之重要依據[9]。

光學顯微鏡觀察法

此法乃1977 年由美國佛羅里達大學 Christie and Edwardson 所發表出來之方法[9]，其主要原理在於利用染色的方法將病毒粒子於寄主細胞中所聚合而成，或者由病毒所合成之蛋白質所聚合而成之內含體 (inclusion body) 加以染色區別，使之在光學顯微鏡下能由肉眼加以辨視，再根據不同病毒所形成之特殊內含體之型態及組成分(譬如核酸或蛋白質) 加以歸納分析使之成爲鑑別病毒之一種依據[16]，此方法之發展主要是爲了克服利用電子顯微鏡時所遭遇之不普及與操作不易之缺點。就受過訓練有經驗之操作人員而言，在短時間內即可判讀分類受檢之病毒至病毒群(group)或屬(genus)之層次。但是對一般研究人員而言，若無良好之經驗背景，則視而不見的仍大有人在。加上技術本身較適合應用於樣品數少的情況，無法適用於大量樣品之檢定，因此此項技術目前通常被界定爲協助病毒分類與鑑別之參考方法，在檢定上則較少使用。

抗血清檢定法

50年代末期科學家開始利用抗血清檢定法進行病毒病的鑑定與診斷[11,13,39]。此法之原理乃基於動物體之免疫系統對侵入體內之外來高分子物質(抗原) 可以產生專一性之對應蛋白質(抗體)，而抗體可與刺激其產生之抗原發生專一性之結合。因此科學家將由感病植物上所抽取純化之病毒，注射於動物體內，使之刺激其免疫系統產生對應之抗體蛋白質，然後將此抗體分離純化出來，作爲檢定病毒感染之試劑。當抗體與未知感染與否之植株汁液接觸時便可找尋其相對應之病毒並與之結合，透過此種緊密的結合科學家即可判定植株是否爲病毒感染者。而且因爲抗原抗體反應屬專一性結合，因此依據使用之抗體種類便可判斷出感染之病毒類別。由於此法具有快速、簡單、敏感與正確的各項優點，至今仍爲病毒診斷與鑑定的主要技術[19]。血清檢定法目前已被科學家針對不同需求改良成多種適合不同狀況使用的方法。其中較值得一題的是免疫擴散法(immunodiffusion)[32]，免疫電顯法(SSEM)[15,27]，ELISA[11,12]，免疫點漬法(immunoblotting)[31]，西方轉漬法(western blotting)(36)，RIPA(37,38)，及免疫螢光法(immunofluorescence)[8,39]等。

1. **免疫擴散法** (SDS-immunodiffusion test)

此法乃於含有12ml 0.8% 瓊脂(Agar) 之9 cm培養皿中打上直徑0.5 公分之孔穴，每組反應

七個孔穴，中央一個而周圍等距排列六個，然後將待檢之植物葉片磨汁加入周圍之孔穴中，而中央之孔穴則加入抗血清，經8-12 小時後即可觀察結果，依中央孔穴與周圍孔穴間產生白色沈澱帶做爲判別正反應之依據。早期的擴散反應所使用的供測植物汁液通常只有將病葉以緩衝溶液磨碎而已，此種方法只能檢測小型顆粒如球形病毒，對於大型如桿狀或絲狀病毒而言則無法適用。因爲大型病毒無法順利在瓊脂中擴散而無法與抗血清發生反應。但1976年Purcifull與Batchlor發表了一系列方法，終於解決了此項問題[32]。他們在瓊脂中加入0.5% SDS，又在製備反應汁液時以1.5%SDS處理，並利用加熱法促使病毒顆粒解離成爲鞘蛋白基本單位(subunit)之溶液，而能順利地在瓊脂中擴散與血清產生沉澱反應。因此不管何種大小之病毒均能以此方式加以檢測。而且此法最大之優點是可以依據沉澱帶之型式而測出二種病毒之血緣關係，這是其他常用之血清檢測法所不及的地方[32]。加上此法所使用之材料及器皿均極爲簡單，可稱是一項經濟有效之方法。其唯一之缺點是敏感度稍低，對於一些病毒濃度較低的植物樣品，可能無法成功加以檢出。

2.**酵素聯結抗體檢定法**(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, **簡稱**ELISA)

早期的抗血清檢定法只能利用抗體與抗原二者結合後所產生的沈澱來加以判斷，故其敏感度常因病毒濃度不足之影響而無法提升[39]。自從1977年 ELISA 發展後，抗原與抗體的反應可以透過與抗體先行聯結的酵素或其他標識物質如放射物質，螢光物質或化學光物質而將反應的訊號加以擴增。此類訊號可以透過訊號接收機加以記錄並可進行定量與定性分析，使其敏感度與實用性更形提高，成爲病毒診斷與鑑定方法的主力[4, 11]。ELISA乃利用 Polystyrene 材質所製成之96 孔穴盤進行血清反應，標準之ELISA又稱爲直接法(direct ELISA)或雙三明治法(double sandwitch ELISA)[12]。首先是將抗體球蛋白(IgG) 吸附固定在反應盤之孔穴中，其次再加入待檢之植物汁液使其與抗體充份反應，2-3小時後將汁液洗去，再加入已被酵素標定之IgG 溶液，若孔穴中有病毒被吸附在盤上之IgG捕捉固定時，則標有酵素之IgG會進一步與病毒發生專一性反應而形成IgG-病毒-IgG-酵素之複合體，當最後加入適當之酵素基質(subtrate)時則會發生分解反應而產生顏色之變化。呈色反應之強弱，可藉由儀器加以判讀並且分析其結果，因此正反應之判別十分客觀乃是此法之最大優點，而爲其他病毒檢定法仰賴操作人依主觀經驗判定所不及[11]。除了抗原與抗體之反應利用標識在抗體上之酵素予以擴增是一大特色外，將抗體或抗原吸附在固態的物體上，使反應能在固定之位置上被偵測則是ELISA的另一項重大突破。ELISA所使用的吸附物質是由polystylene所製成的96孔穴盤，可以同時進行96個樣品的檢定，工作效率很高。另外ELISA所使用之抗體稀釋倍數高，在血清的使用上遠比前述之擴散法經濟，加上其敏感度與結果重現性均十分優異，因此ELISA 早被公認爲最適合專供檢定大量樣品之方法[4]。近年來ELISA 由早期的直接將酵素標定在抗體上的直接法，已蛻變爲各式各樣適合不同需求的修正法(modified method)。其中最值得一提的是將酵素標定在可與抗體產生專一性反應的二次抗體(secondary antibody)上的修正法[7]。此種標定酵素之二次抗體並不需由研究人員製備而可向專門廠商購買，不僅節省研究人員之時間且由於品質穩定，使得反應結果之重現性更形提高。此種修正法吾人通稱爲間接反應法(indirect ELISA)。文獻上有關ELISA之步驟與論著相當多[4,11]，讀者可以自行參考詳加研究。

3. **免疫點漬法**(Immuno-blotting)

此種檢定法嚴格說來應可列爲ELISA之一種修正法，其原理與間接ELISA完全相同[2,20,31]。二者之差異在於點漬法是將待檢植物之汁液直接滴在特殊材質之紙膜(membrane)上，此種紙膜即相當於ELISA的反應盤，可將植物汁液中之各種成份吸附固定，便於後續抗體之反應。最常用之紙膜是硝化纖維(nitrocellulose membrane)，近年來又有多種不同材質之紙膜已商業化銷售中。不同材質之紙膜分別適合不同狀況使用，讀者應參考其產品說明才能適當加以應用。免疫點漬法有時因樣品處理方式之不同而被稱爲組織壓片法(tissue printing)等[25]，事實上其基本原理是完全一致的。此類方法與ELISA最大的差異在於immuno-blotting可隨樣品數之多寡而調整紙膜之大小，故可適應不同大小樣品數之需求。而不會如ELISA受限於反應盤之大小，僅適合檢查大量的樣品。換句話說即點漬法比ELISA對樣品數的多寡有較佳的彈性。至於反應敏感度與結果之重現性則二者間並無太大差異。另外，ELISA所得之呈色反應爲溶液狀態，故可利用機器判讀顏色之深淺。而點漬法之呈色反應屬於一種不溶性之著色，故只能以肉眼判別而無法藉重儀器之判讀，因此其正負反應之判斷較爲主觀。不過此項缺點近來已因雷射光之應用而被改善，日後點漬法之結果亦將可被數位化，增加結果判斷之可靠性。

4. **免疫電顯法**(Immuno-electron microscopy, **簡稱**IEM)

由名稱上可看出此方法乃電顯觀察與血清檢定的綜合法。依進行程序之不同可將此法細分成：

a. 修飾法(Decoration method)

此法乃將病毒先吸附固定於電顯銅網上，再加入抗體使之與病毒反應[27]。正反應之病毒顆粒表面會因抗體之結合而在電顯觀察下呈現薄層霧狀構造。而負反應者則維持原來外型。此法最主要是被應用在研究病毒間之血緣關係[27]，或檢查植株中是否有不同病毒複合感染。在大量樣品之檢定上較不適用。

b. SSEM (Serological specific EM)

此法之執行程序恰與修飾法相反[15]。先在銅網上將抗體固定，再與待檢之植物汁液反應。在正反應之銅網上即可觀察到多數被抗體捕捉(trapped)之病毒顆粒。此法不僅可被用來研究病毒間的血緣關係，而且適合作爲檢定病毒感染之用，根據報告其敏感度相當高，執行步驟也算簡易[15]，唯一之缺點是電顯不易取得與操作經驗之限制。

5. **西方轉漬法**(Western blotting)

此法之原理與點漬法完全相同[36]，二者之差異僅在於western blotting之樣品在吸附到紙膜前乃先經電泳(electrophoresis)分離，再利用電泳或其他方式將分離後蛋白質轉漬到紙膜上，爾後所進行之抗體反應則與點漬法完全相同[36]。此法之優點在於可觀察與抗體發生專一性反應之標的蛋白質之數目及分子量，以協助病毒種類之鑑別。western blotting 由於步驟較點漬法繁瑣，故通常不被用於大量樣品之篩檢，而僅供少量樣品鑑定病毒種類之用。

6. **免疫螢光法**(Immunofluorescence test)

免疫螢光法之基本原理與ELISA完全相同，二者差異在於標識物質不同而已[39]。螢光染料所用來標定抗體之螢光物質種類很多，較常用的是FITC及rhodamine，但近年來已有多種物質被開發應用於此用途上。螢光物質被標定在抗體上而與抗原病毒反應結合後，可使病毒在特殊波長之光波下被激發，產生肉眼可視之螢光。因此在顯微鏡下即可判斷出細胞中病毒

聚合之位置。利用對應病毒所合成之其他非構造性蛋白之抗體，也可偵測出此類蛋白在感染過程中所產生之位置及移動之過程[7, 8]。因此螢光抗體技術之開發對增進學界就病毒感染過程之了解貢獻不少。不過此項技術由於步驟繁瑣較少被用來做爲大量樣品之篩檢。

7. **快速免疫濾紙檢定法**(Rapid Immunofilter Paper Assay, 簡稱RIPA)

上述六種血清檢定法中除了擴散法在操作上較爲簡易外，其餘五種方法雖然在敏感度上較爲優異，但是大都步驟繁瑣，或者需要使用精密貴重儀器才能進行。因此上述方法均只能在實驗室內由專人負責操作判讀，而無法適用於田間現場植物病毒病之立即檢測。此項需求一直到1992年日本東京農大津田教授之研究發表後才露出曙光[37, 38]。津田等人利用紅白兩種不同顏色之乳膠粒(latex beads)，分別吸附相同的抗體。將白色乳膠粒於8 x 0.5 cm之濾紙條上距頂端1.5cm 處塗抹成一細線。陰乾後此濾紙條可於室溫乾燥箱中儲藏達一年以上。測定病毒時將紅色乳膠粒稀釋於緩衝溶液中並與待檢之植物汁液等量混合。若汁液中有標的病毒存在，則病毒會與吸附在紅色乳膠粒上的抗體反應而被乳膠粒捕捉。當後續把含有白色乳膠粒的濾紙條浸入上述溶液時，捕捉有病毒之紅色乳膠粒可藉由毛細現象往上移行，當接觸到白色乳膠粒時，紅白乳膠粒與病毒即可結合形成複合體，而在塗抹白色乳膠粒之部位逐漸累積形成肉眼可視之紅色細線。反之，若待檢汁液中無病毒存在，則紅色乳膠粒無法與白色乳膠粒結合，即不會在該處累積成紅線。根據津田等之結論，此一方法適合小型病毒如CMV及TMV之檢測，對於大型病毒而言，由於其在濾紙上之滲透移行性不佳，故並不適用[38]。RIPA 檢定之靈敏度與ELISA不相上下。此法由於可以在現場直接檢測植株，所使用之材料除乳膠粒稍貴外，其餘均極簡單便宜。測定結果可以肉眼直接判讀，亦可以700nm光波掃描，因此十分簡易與客觀，可稱是一項極適合現場人員應用的方法。其最大的缺點在於並非所有病毒均能適用，有待研究人員繼續開發改良以增加其適用性。

鞘蛋白trypsin裂解圖譜比較

Shukla等人於1988年提出一項可以精確地鑑別病毒種類的方法[35]；將純化之病毒鞘蛋白以蛋白腖trypsin裂解處理隔夜後，以HPLC將裂解後蛋白鏈片斷分離30分鐘，再與已知病毒經相同方式處理之鞘蛋白裂解圖譜比較；當彼此序列相似度(sequence identities)超過90% 時則屬相同病毒之不同系統(strain)，若相似度低於75% 則被視爲不同之病毒。如今由於大多數已知病毒之鞘蛋白trypsin 裂解圖譜均已被建立成完整之資料庫，因此當一未知病毒經此方法處理後，即可與已知圖譜比較而鑑別出病毒之身份。此方法之精確度與結果重現性極高，加上操作簡單快速目前已廣爲應用爲快速鑑定病毒種類之方法[35]。過去許多不易分別的病毒系統，均已因此法而確定了分類地位[35]。

雙鏈型核醣核酸dsRNA圖譜之比較

許多RNA病毒在感染寄主植物的過程中會合成雙鏈型核醣核酸(dsRNA)[29]。Morris and Dodds [28]應用合成CF-11樹脂可以將植物組織中之dsRNA片斷在不同濃度之酒精下加以分離，所得試料再利用電泳加以分析。由於不同病毒屬具不同之核酸組成與表現方式，其dsRNA片斷種類，數目及分子量大小均會有所差異，因此利用此法可以快速精確地判別不同的病毒屬(genus)[29]，但對於同屬之不同種(species)病毒而言，此法則無法區別。此方法特別適用於鑑定不易分離的木本植物或菌類病毒(fungal viruses)，此類病毒由於接種不易或因濃度低不易純化分離，常難以鑑

別分類。此法可於短時間內快速加以鑑定至病毒屬之層次[29]。

核酸探針檢定法(DNA probe indexing)

除了利用抗體所進行之診斷方法以外，近十年來由於遺傳工程生物技術之快速發展，病毒診斷與鑑定也逐漸步入核酸鑑定時代。例如核酸探針 (DNA probe) 檢定技術就是其中之一種[5,17,40]。此法乃利用與病毒核酸互補而且標定有放射性或非放射性物質的一段核酸片斷做爲試劑，使其與供測病毒核酸發生雜配(hybribization) 反應，其正反應之結果則可以偵測其放射性或以標定酵素之抗體加以偵測出來。核酸探針偵測病毒的敏感度顯著高於抗血清檢定法[40]。不過由於偵測核酸時的抽取工作較爲繁複，遠不如一般抗血清法簡易。加上如果使用放射性元素標定時，在使用上又有安全性之考量。因此核酸探針檢定法目前大都使用在某些專業研究室針對少量重要標本進行檢定，其普及性尚不如抗血清檢定法。晚近有些非放射性之標定法被發展出來，包括呈色法及冷化學光法等等。但是此類方法目前仍有背景值偏高及敏感度降低的問題，有待學界繼續努力開發修正，使之成爲更安全敏感且簡便易行之方法。

聚合酶聯鎖反應檢定法

1987年Kary Mullis發展出一種極具强大功能之核酸偵測法，稱爲polymerase chain reaction (PCR)[24]。此法乃利用目標核酸片斷之上下游序列以人工方法先各合成一含10-20個核苷酸的片斷。利用此二片斷當做引子(primer)在含有核苷酸及聚合酶(polymerase)的情況下，可以發生聯鎖複製的反應而將該目標核酸序列於短時間內快速增殖。而後再用電泳法將複製之核酸片斷加以分析[24]。由於設計引子對的時候已掌握該標的核酸片斷的分子量大小，因此由電泳分析結果即可由與預測相符之核酸片斷之出現與否，判斷出是否爲病毒感染之植株。此偵測法之靈敏度是所有已知的檢定法中最高者；據估計高出ELISA 10^7 倍以上，而比DNA probe高出10^4 倍。但是也由於此一偵測法極端敏感，故操作時稍一不慎有所污染，即可造成假正值(false positive)而引起誤判，應用時不可不慎。另外，此項技術使用前必需對標的病毒之核酸序列有所了解才能執行，因此對於尚未完全研究透徹或是研究難度較高的病毒，便無法立即著手檢查爲其較大之限制。又技術操作時需要有豐富經驗，優良之實驗室設備及經費預算，也是PCR檢定法全面普及之另一項限制。不過PCR自從1987年發展自今，許多在病毒檢定上被視爲高難度的問題均已被其突破，其中值得一提的是：

1. 利用系統專一性核酸序列引子對(strain specific primer pair)，可以在病毒族群中立即偵測出特殊系統之存在[22, 33, 34]。
2. 利用所謂的病毒屬或種專一性引子對(genus or species specific primer pair)，可以快速鑑別標的病毒之分類地位[21, 24]。
3. 配合限制酶分解技術可以在短期間了解病毒系統間核酸序列之差異[14]。
4. 在不需選殖(cloning)標的核酸之前題下可以快速合成該核酸片斷之核酸探針[1]。
5. 可以快速選殖標的核酸片斷，供進一步之分析研究[30]。

在研究人員不斷積極的努力下，PCR已經被證實具有超强的病毒檢定能力與不可限量的開發潛力。相信許多過去認爲極端困難的目標，在可見的未來必將逐一被突破。PCR 之發展只是一項例證，在人類無止盡的想像空間下，似乎困難的事只是一個過程而已，絕非是必然。

結 語

由病毒檢定法發展之歷史可以看出技術發展由早期的由簡入繁，而又逐漸蛻變爲轉繁爲易之趨向。事實上各項技術之發展均有其各自不同之需求背景。孰優孰劣，很難遽下結論。所謂戲法人人會變，各有巧妙不同。病毒之檢定亦是如此，用的巧用的恰當，才是檢定病毒的極致。當然也有部份人士喜好追求新奇，爲發展新的檢定技術，追上時代潮流而向前衝刺。然而筆者深信，病毒檢定與診斷之目的在於準確地診斷出病毒種類與存在的有無，必須能達成此目的，而又能節省人力、物料、設備與時間等資源的技術才是最符合人類需求的技術。

參考文獻

1. Akin, A., Wu, C. C., Lin, and T. L., Keirs, R. W. 1993. Chemiluminescent detection of infectious bursal disease virus with a PCR-generated non-radiolabeled probe. J. Vet. Diagn. Invest. 5:166- 173.
2. Banttari, E. E., and Goodwin, P. H. 1985. Detection of potato virus S, X, and Y by enzyme-linked immunosorbent assay on nitrocellulose membranes (Dot- ELISA). Plant Dis. 69:202-205.
3. Bariana, H. S., Shannon, A. L., Chu, P. W. G., and Waterhouse, P. M. 1994. Detection of five seedborne legume viruses in one sensitive multiplex polymerase chain reaction test. Phytopathology 84:1201-1205.
4. Bar-Joseph, M., and S. M. Garnsey. 1981. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Principles and applications for diagnosis of plant viruses. pp.35-59 In K. Maramorosch and K. F. Harris, eds. Plant diseases and Vectors:Etiology and Epidemiology. Academic Press, N. Y.
5. Bijaisoradat, M., and Kuhn, C. W. 1988. Detection of two viruses in peanut seeds by complementary DNA hybridization tests. Plant Dis. 72:956-959.
6. Bos, L. 1983. Introduction to plant virology. L. Bos. ed. Longman, London and New York, 160 pp.
7. Chang, C. A. 1986. Bean yellow mosaic and clover yellow vein virus: Purification, characterization, detection and antigenic relationships of their nuclear inclusion proteins. Ph. D. dissertation. Univ. of Florida, 135 pp.
8. Chang, C. A., Purcifull, D. E., Hiebert, E., and Edwardson, J. R. 1986. Immunofluorescence evidence for the origin of nuclear inclusion and cytoplasmic crystals induced by bean yellow mosaic virus.Phytopathology 76:1061.
9. Christie, R. G., and Edwardson, J. R. 1977. Light and electron microscopy of plant virus inclusions. Fla. Agric. Exp. Stn. Mongr., Ser. 9, 155 pp.
10. Christie, S. R., Purcifull, D. E., Crawford, W. F., and Ahmed, N. A. 1987. Electron Microscopy of negatively stained clarified viral concentrates obtained from small tissue samples with appendices on negative staining techniques. Fla. Agr. Exp. Sta. Tech. Bull. 872, 45 pp.
11. Clark, M. F. 1981. Immunosorbent assays in plant developments in plant virology. Ann. Rev.

phytopathol. 19:83-106.

12. Clark, M. G., and Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. of Gen. Virol. 34:475-483.
13. Clark, W. R. 1983. Experimental Foundations of Modern Immunology. 2nd ed. John wiley Sons, N. Y. 453 pp.
14. Dekker, E. L., Derks, A. F. L. M., Asjes, C. J., Lemmers, M. E. C., Bol, J. F., and Langeveld, S. A. 1993. Characterization of potyviruses from tulip and lily which cause tulip-breaking. J. of Gen. Virol. 74:881-887.
15. Derrick, K. S. 1973. Quantitative assay for plant viruses using serologically specific electron microscopy. Virology 56:652-653.
16. Edwardson, J. R., and Christie, R. G. 1978. Use of virus-induced inclusions in classification and diagnosis. Ann. Rev. Phytopathol. 16:31-55.
17. Frenkel, M. J., Jilka, J. M., Shukla, D. D., and Ward, C. W. 1992. Differentiation of potyviruses and their strains by hybridization with the 3' non-coding region of the viral genome. J. of Virol. Methods 36:51-62.
18. Gibbs, A. J., and B. Harrison. 1976. Plant Virology. The Principles. Halsted Press (John Wiley), N. Y. 292 pp.
19. Hamilton, R. I., Edwardson, J. R., Francki, R. I. B., Hsu, H. T., Hull, R., Koenig, R., and Milne, R. G. 1981. Guidelines for the identification and characterization of plant viruses. J. gen. Virol. 54:223-241.
20. Hsu, Y. H. 1984. Immunogold for detection of antigen on nitrocellulose paper. Ana. Biochem. 142: 221-225.
21. Karasev, A. V., Nikolaeva, O. V., Koonin, E. V., Gumpf, D. J., and Garnsey, S. M. 1994. Screening of the closterovirus genome by degenerate primer-mediated polymerase chain reaction. J. Gen. Virol.. 75:1415-1422.
22. Kohnen, P. D., Johansen, E. E., and Hampton, R. O. 1995. Characterization and molecular detection of the P4 pathotype of pea seedborne mosaic potyvirus. Phytopathology 85:789-793.
23. Kurstak, E. (ed.) 1981. Handbook of Plant Virus Infections. Comparative Diagnosis. Elsevier/ North Holland Biomedical Press, N. Y. 943 pp.
24. Langeveld, S. A., Dore, J. M., Memelink, J., Derks, A. F. L. M., Vlugt, C. I. M. van der, Asjes, C. J., and Bol, J. F. 1991. Identification of potyvirus using the olymerase chain reaction with degenerate primers. J. Gen. Virol. 72:1531-1541.
25. Lin, N. S., Hsu, Y. H., and Hsu, H. T. 1990. Immunological detection of plant iruses and a mycoplasmalike organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membrane. Phytopathology 80: 824-828.
26. Matthews, R. E. F. 1981. Plant Virology. 2nd Ed. Academic Press, N.Y. 897 pp.
27. Milne, R. G., and E. Luisoni. 1977. Rapid high-resolution immune electron microscopy of virus preparations. *In* K. Maramorosch and H. Koprowski(eds.), Methods in Virology Vol. 6, pp. 265

-281.

28. Morris, T. J., and Dodds, J. A. 1979. Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. Phytopathology 69:854-858.
29. Morris, T. J., Dodds, J. A., Hillman, B., Jordan, R. L., Lommel, S. A., and Tamaki, S. J. 1983. Viral specific dsRNA: Diagnostic value for plant virus disease identification. Pl. Mole. Bio. Rept. 1:27-30.
30. Nicolas, O., and Laliberte, J. F. 1991. The use of PCR for cloning of large cDNA fragments of turnip mosaic potyvirus. J. Virol. Methods. 32:57-66.
31. O'Donnell, I. J., Shukla, D. D., and Gough, K. H. 1982. Electro-blot radioimmunoassay of virus -infected plant sap- a powerful new technique for detecting plant viruses. J. of Virol. Methods 4:19- 26.
32. Purcifull, D. E., and Batchelor, D. L. 1977. Immunodiffusion tests with soudium dodecyl sulfate (SDS) treated plant viruses and plant viral inclusions. Fla. Agr. 0Exp. Sta. Tech. Bull. 788, 39 pp.
33. Rizos, H., Gunn, L. V., Pares, R. D., and Gillings, M. R. 1992. Differentiation of cucumber mosaic virus isolates using the polymerase chain reaction. J. Gen. Virol.. 78:2099-2103.
34. Rush, C. M., French, R., and Heidel, G. B. 1994. Differentiation of two closely related furoviruses using the polymerase chain reaction. Phytopathology. 84:1366-1369.
35. Shukla, D. D., McKern, N. M., Gough, K. H., Tracy, S. L., and Letho, S. G. 1988. Differentiation of potyviruses and their strains by high performance liquid chromatographic peptide profiling of coat proteins. J. of Gen. Virology 69:493- 502.
36. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. P. N. A. S. USA 76: 4350-4354.
37. Tsuda, S., Kameya-Iwaki, M., Hanada, K., Fujidawa, I., and Tomaru, K. 1993. Simultaneous diagnossi for plants infected with multiple viruses employing rapid immunofilter paper assay (RIPA) with two-step method; multi-RIPA. Ann. Phytopath. Soc. Japan 50:200-203.
38. Tsuda, S., Kameya-Iwaki, M., Hanada, K., Kouda, Y., Hikata, M., and Tomaru, K. 1992. A novel detection and identification technique for plant viruses: Rapid immunofilter paper assay (RIPA). Plant Dis. 76:466-469.
39. Van Regenmortel, M. H. V. 1982. Serology and immunochemistry of plant viruses. Academic Press, N. Y. 302 pp.
40. Wetzel, T., Tavert, G., Teycheney, P. Y., Ravelonandro, M., Candresse, T., and Dunez, J. 1990. Dot hybridization detection of plum pox virus using 32P- labelled RNA probes representing non-structured viral protein genes. J. of Virol. Methods 30:161-172.

Techniques for Diagnosis and Identification of Plant Viruses

Chin-An Chang
Department of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute

Abstract

In recent years, international trade of agricultural products has never been so frequent ever due to the fast developing transportation system in the world. It is, therefore, imperative for each country to adopt adequate quarantine procedures to prevent the invasion of foreign pests or diseases. The ispection of fungal or bacterial diseases may be easier than that of viral ones because of the visibility of the symptom of the causal agents by microscopy. Detection of viruses in plant materials, however, are not reliable based only by symptomatology. Many factors may affect the appearance of visible symptoms so that it is necessary to apply some more sensitive techniques to diagnosis or identify a viral diseases. In the old days, diagnosis of plant virus diseases has to go through a series of procedures such as isolation, growing out for symptom reading and indicator plant inoculation. These procedures usually are time, space and labor comsuming that do not meet the requirement for efficiency in quarantine process. Since 1950s, people have recognized the urgent needs of more sensitive and efficient techniques than the traditional symptom reading ones to detect and identify plant viruses. This paper lists and discusses the advantages and shortcomings of various techniques developed since 1950s for this purpose. Emphasis shoud be made here that no single technique can dominate others in every situations. In other words, each technique may be suitable for some but not all situations. Therefore, specific techniques must be designed and tested to deal with the requirement of each specific situations.

Key words: virus, plant viruses, diagnosis, identification.

「植物保護新科技研討會」專刊
臺灣省農業試驗所特刊第57號 pp. 47-55 (1996)

園藝作物抗蟲育種

陳 炳 輝
臺灣省農業試驗所

摘要：園藝作物之重要性隨消費水準之提升而日增，爲使消費者得到清潔安全之果蔬類，利用抗虫育種方法來防治害虫以減少施藥，避免殘毒危及人畜，遂日受重視。本文就發展作物抗虫研究之條件、目前國內外研究現況如：抗性來源之收集、測試；抗虫機制之測定；抗性遺傳之研究；作物外部形態與抗虫性之關係；作物抗虫之生化分析；因作物別或抗虫因子之不同而進行各種育種方法；以及探討抗虫作物如何予以利用等，分別就較重要之園藝作物舉以實例說明。

關鍵詞：園藝作物、抗蟲研究、育種。

前 言

園藝作物是近年來本省推展精緻農業之主力，其重要性至爲明顯，雖然種類繁雜，但以果蔬類提供人類營養所需之維他命與礦物質來源，而與日常民生息息相關。過去爲維持高產量、高品質之果蔬生產，一直依賴化學藥劑以防治病虫害，但因此提高生產成本，且長久以來，造成害虫產生抗藥性、農藥殘毒污染環境、危及人畜等問題。因此，園藝作物抗虫研究發展便日趨受重視。欲發展抗虫作物，必須瞭解作物與害虫間之相互關係、抗性來源，從抗虫作物之外部形態、內部生化及遺傳基礎上去探討。而瞭解抗性機制後，可引導正確之選育方法，以育成抗虫品種。雖然園藝作物抗虫研究工作，本省目前尚未萌芽，然而將來發展亦屬必然之趨勢。本文討論抗虫研究之基本理論與實例、目前在國外之發展概況，俾提供相關工作人員之參考。

發展作物抗虫研究之工作條件

團隊合作制度之建立：

成員包括育種、昆虫、遺傳、園藝及病理等有關人員，各職所司。成員間互相接觸、討論以達成目標。譬如，育種者收集不同種源，並將抗虫因子導入園藝性狀佳、可被接受之品種中。而昆虫人員則負責設計、執行種源之抗虫檢定工作，並維持飼育害虫族群隨時供應。

文獻資料之收集：

各成員儘可能從期刊及各種資料來源收集相關資料，並互通有無。

有完整的標的害虫與作物之資料：

如對害虫之分類地位、生活史、生理、形態、地理分佈、寄主範圍、遺傳、天敵種類及飼育

技術等。而對作物之外部形態、繁殖方式、生長習性、地理起源與分佈、遺傳分類地位及經濟重要性等均須充分瞭解。

檢定抗性種源之建立：

包括田間檢定圃之設立與室內檢定二種，各有其相對的必要性及優缺點，最好二者均備。一般來說，田間檢定圃之優點，在於自然發生之害虫族群，不須檢定人員花時間做人工接虫工作，能檢定大量之品系材料，而且田間之害虫族群最具代表性，檢定之結果正確性可靠，較能眞正反應害虫與供試作物品種(系)之交互作用。而其缺點，則爲每年害虫發生之程度無法掌握預測，且田間害虫之分佈亦難均勻，故結果之誤差變異較大，受外在因子影響較大。而且如果害虫僅年生一代，則須在極短之時間，把握住眾多材料之檢定工作，執行上負荷恐過重。

相反的，室內檢定之優點，則是全年均可進行，不受時空之限制，害虫族群可控制，減少供試材料發生免除(escape)，造成假抗性現象。而且害虫與供試材料之最適期可相配合，可控制環境因子之影響至最小，而得到最正確之害虫與作物間關係。缺點則是室內飼育之虫子，因缺乏自然環境之選汰，較難代表田間之自然族群，而室內飼育之害虫族群密度往往過高，易受病感染，維持族群不易。

目前研究現況

抗性來源

欲抗虫育種成功端視是否有效、簡單而可靠之方法以檢定測試抗虫種源。一般來說，種源(germplasm)可在田間篩選或室內檢定。通常是先在田間篩選，將大量之感虫材料淘汰，表現良好者，再於室內接受檢定，並進一步測試是否具抗生作用。進行室內測定必須注意以下各點：

1. 考慮到室內栽種之作物生育狀況。
2. 對於標的害虫之生物學、生態行爲、取食、產卵、移動、存活率等，必須充分瞭解。
3. 供接種虫源虫期須一致均勻。
4. 受檢種源之生育期須一致且適期，並包括許多不同之來源。

接種後，按供試種源之反應或害虫之族群變化等結果，以評定受檢各品系之抗性或感虫等級。所收集之供試種源，通常應包括野生種、當地品系、新、舊栽培品種以及一些高級品系。下列將討論不同作物對抗虫來源之研究現況：

A. 茄科作物(Solanaceous crops)：

1. *Solanum* 屬之種類：

馬鈴薯(*S. tuberosum*)之抗虫性比較低，較少利用價值，大多數之抗性都源自野生種。從南美阿根廷與秘魯收集之種源，發現 *S. brachistotrichum* 對桃蚜具抗性。此外有六種具低度抗性。茄子(*S. melongena*)也是 *Solanum* 屬之重要作物，受螟虫爲害至鉅。篩選抗虫結果顯示，栽培品種當中無一具抗性者，但野生種 *S. khasianum* 則具抗虫性。

2. 番茄屬 *Lycopersicon* 種類：

番茄夜蛾(*Heliothis armigera* 與 *H. zea*)係最嚴重之害虫，其初齡與二齡幼虫嚙食番茄葉片，三齡以後則侵入果實爲害。篩選大量種源結果發現 *L. hirsutum* f. *glabratum* 對 *H. armigera* 具高度抗性。而在篩選 1,030 個所收集到之番茄(*L. esculentum*)種原中，一個品種

(Ting Tim)對 *H. zea* 之感虫性最小，取食具抗性品系之夜蛾幼虫，其存活率與發育情形均受影響(Kennedy et al., 1987)。

潛葉蠅類(*Liriomyza* spp.)亦是番茄之重要害虫。供試品系中，PI 126449 較具抗性，其葉片較少被潛蠅爲害。

對於粉蝨(whitefly)之抗性檢定結果，發現 *L. hirsutum*、*L. hirsutum* f. *glabratum* 以及 *L. pennellii* 表現高度抗性，*L. hirsutum* f. *glabratum* 之抗性，已經由回交法轉至栽培品種 *L. esculentum*。

B. 豌豆(peas)與豆類(beans)：

葉潛蠅、豆蚜(*Aphis pisum*)及豆象鼻虫(*Sitona lineatus*)係豌豆最重要之害虫。對 *Pisum sativum* 的不同品系進行篩選發現 LMR4、LMR10 及 LMR20 對潛蠅之抗性較好，餘皆感虫。Peso 等人篩選品系對象鼻虫之反應，發現一些 PI 品系如 PI 196027、244241 及 280612 等具抗性。

而豆類 *P. vulgaris* 對豆莢象鼻虫(*Thanatephorus cucumeris*)之抗性檢定結果，數個品系 'Bat 1235'、'S 6038' 等具容忍性。在 1,075 個 *P. vulgaris* 品系對普通豆象鼻虫(*A. obterctus*)之反應時，發現大多數均爲感虫，而多數之野生種品系則爲抗性。

C. 瓜類(cucurbits)：

抗虫研究工作主要著重於甜瓜(*Cucumis melo*)、胡瓜(*C. sativus*)及南瓜(*Cucurbita moschata*)等作物種類。瓜實蠅(*Dacus cucurbitae*)是主要之害虫。幾乎所有的網紋甜瓜(musk-melon)均爲感虫，僅野生種 *Cucumis callosus* 發現抗性。對瓜蚜之抗性檢定，發現"Home-garden"甜瓜具抗蚜性，另一品系之蚜虫棲息密度，在田間與室內均比標準品種爲少。

D. 十字花科類(cole crops)：

有關抗虫之研究較多，如抱子甘藍、甘藍、花椰菜等抗蚜虫(*Brevicoryne brassicae*)、擬尺蠖蛾(*Trichoplusia ni*)、甘藍螟蛾(*Mamestra brassicae*)及紋白蝶(*Pieris rapae*)等。抱子甘藍的一種紅葉品種"Rubin"比綠葉品種較抗紋白蝶與甘藍螟蛾。而某些品種對蚜虫之忍受性較高，受害後有能力迅速復原。在甘藍方面，紅色品種 Storage red 4004 抗紋白蝶，而 PI 296133 與 PI 302985 二品系則抗擬尺蠖。在花椰菜方面，PI 234599 與 PI 343483 二個品系抗小菜蛾、擬尺蠖與紋白蝶。Lin *et al.* 發現小菜蛾在抗虫之花椰菜品系 PI 234599 上，其幼虫無法完成發育(17)。

抗虫機制之探討：

據 Kennedy 博士調查統計得知，研究人員至少對23種蔬菜類進行抗虫性相關研究(13)。這些蔬菜種類有：豆類(beans)、胡蘿蔔、十字花科類如甘藍、花椰菜等，瓜類(cucurbits)、萵苣、豌豆、茄科蔬菜(solanaceous vegetables)包括茄子、馬鈴薯、番茄等。部分之抗虫機制也已做了探討，屬於抗生作用的有：茄子(*Solanum melongena*)對一種葉蟬，*Amrasca biguttula*；番茄(*Lycopersicon esculentum*)對番茄夜蛾(*Heliothis zea*)；豌豆(*Pisum sativum*)對豆蚜(*Acyrthosiphon pisum*)；豆類(*Phaseolus vulgaris*)對豆象(*Acanthoscelides obtectus*)；甘藍對甘藍尺蠖蛾(*Trichoplusia ni*)等。

屬於非偏好性(nonpreference)之抗性機制者有：十字花科蔬菜葉面皮層腊質對葉蚤具抗棲作用(12)；黃秋葵(*Abelmoschus esculentus*)對一種葉蟬(*Empoasca devastans*)；豆類對一種葉蟬(*E.*

kraemeri)；抱子甘藍(brussels sprouts)對一些鱗翅目害虫；及蕪菁(turnip)對蕪菁蚜虫等。而在某些蕪菁品系也對蚜虫表現出忍受性(tolerance)。Bohn *et al.*(3)發現洋香瓜品系 LJ 90234 對瓜蚜(*Aphis gossypii*)之抗性包括抗棲、抗生及忍受性等三個機制。

果樹研究方面，葡萄抗根瘤蚜虫屬於非偏好性反應。而蘋果抗蚜虫則爲抗生作用，因爲蚜虫在極抗之蘋果上取食後，無法繁衍下一代。蘋果對蘋果蛾(codling moth)之抗性機制未知，但梨對其抗性與抗生性有關。屬於忍受抗性的有桃樹螟虫(*Sanninoidea exitiosa*)。

抗性遺傳研究：

研究園藝作物抗虫性之遺傳，通常亦將抗虫品系(種)與感虫者交配，所得之F_1、F_2與回交後代，進行接虫檢定。計數分離後代之受害與健株之數目，以供估測其抗性係由幾個與何種基因所控制。儘管抗虫之作物不少，但僅有部份能進行其抗性之遺傳研究，最主要的原因在於抗虫性普遍低，因而較難分辨抗或感虫。另外往往害虫飼育不易，無法大量飼育，供應人工接虫以檢定分離後代用，因此影響到抗性之遺傳分析。

在蔬菜類，作物抗性遺傳研究主要以番茄(*Lycopersicon* spp.)、瓜類(cucurbits)、豇豆(cowpea)等。番茄的一種，*L. hirsutum* f. *glabratum*，已知對番茄夜蛾(*H. zea*)具高度抗生性。經抗性遺傳分析，得知此抗生作用係由隱性因子(recessive factor)所控制，該種番茄對另一種夜蛾(*H. armigera*)之抗性遺傳研究顯示，其分離後代並沒顯現清楚的遺傳比率，因此可證明其對 *H. armigera* 之抗性係由二個因子以上所控制。Lin et al.(17)報導具抗性之花椰菜與甘藍，其葉呈暗綠光滑之特性具遺傳性，廣義遺傳率分別爲 0.75 與 0.88。

甜瓜的一種育成品系 LJ 20234，對棉蚜(*Aphis gossypii*)表現容忍抗性(tolerance)、遺傳分析結果得知此抗性係由一個顯性之單一因子所控制，該因子經命名爲 Ag 因子，而 LJ 90230 品系對 *A. gossypii* 之容忍性因子則較複雜(4)。Kishaba *et al.*(16)發現洋香瓜品系 PI 371795 抗瓜蚜之抗生作用係由一對顯性因子所控制。而甜瓜對瓜實蠅之感受性，已知係由二個互補之顯性因子所控制。在南瓜(summer squash)抗椿象(squash bug)之遺傳研究發現F1呈感虫反應，而F_2則表現出連續性變異，此顯示抗南瓜椿象係由數量因子(quantitative factors)所支配，這些因子之數目估計約在 3～6 個之間，而至少是 3 個以上。同樣的，南瓜抗黃條葉蚤(striped cucumber beetle)亦由數量因子所控制。Reinink *et al.*(24)研究萵苣對桃蚜之部分抗性得知，此抗性亦由數量因子所控制，有因子上位性效應(epistatic effects)。

作物外部形態之抗性：

作物之某些外部形態特徵能影響害虫之發生，這些特徵可加以利用。現依作物種分述如下：

1. 茄科作物之茄屬(*Solanum*)種類：

S. berthaultii 之有腺細毛(grandular trichomes)，密佈於葉片及枝幹上，可當作對桃蚜(green peach aphid)與馬鈴薯葉蟬(potato leafhopper)之防禦工具，此種特徵可轉移至一般馬鈴薯品種(*S. tuberosum*)，此種分佈在 *S. berthaultii* 葉部之B型細毛，可干擾桃蚜之取食，其分泌物可降低桃蚜之傳病率。而從此細毛分泌出之黏液，能捕捉蚜虫，使之死亡。具此種能捕捉蚜虫之細毛，能在 *S. tuberosum* 與 *S. berthaultii* 之雜交種出現(15)。因此，利用此由單因子顯性之野生馬鈴薯抗虫特性於一般馬鈴薯品種上，似乎可行。

2. 番茄屬(*Lycopersicon*)之種類：

野生 *Lycopersicon* 種類之有腺細毛在抗虫上佔很重要之角色。*L. hirsutum* 之細毛長且密，抗許多種害虫。其他 *Lycopersicon* 屬種類之有腺細毛對科羅拉多馬鈴薯甲虫(Colorado potato beetle)、粉蝨(white fly)、煙草葉蚤(tobacco flea beetle)、馬鈴薯蚜虫等均具抗性(1)。番茄抗夜蛾(*H. armigera*)幼虫之部位在果實外皮附近，根據觀察，夜蛾幼虫之發生密度與果實外皮長度、花萼之質地及花數有關。一般而言，小果實加工品種受害較輕，而大果實品種往往受害嚴重。

3. 豌豆類：

細毛數及密度與抗虫性成正比，在 *Vigna unguiculata* 豆莢之厚度與豆象鼻虫之穿入呈負相關，而品種間之厚度差異頗大。鉤狀細毛(hook trichomes)對害虫是一物理障礙。豆類之有鉤狀細毛對葉蟬等體質較軟之害虫可造成穿刺等傷害。此有鉤狀細毛可穿刺馬鈴薯葉蟬近腿節之腹部組織，而具抗性。

4. 瓜類：

具光滑葉面之品種比具絨毛者對瓜類之一種害虫 pickleworm 較具抗性，原因是該害虫成虫在光滑品種產卵較少。此種非偏好性反應，可能與光滑葉面對害虫產卵無法產生觸覺性刺激(tacticle stimulus)有關。在南瓜屬(*Cucurbita*)之種類，維管束硬者受南瓜螟蛾(squash vine borer)幼虫食害減少而抗性較强。

5. 十字花科類(cole crops)：

色澤、腊質或光滑葉面對害虫之抗性反應因作物與害虫之種類而異。如具腊質葉面之抱子甘藍品種較少受葉蚤(flea beetle)之取食。相反的，具腊質之一種芥藍(Marrow-stem kale)易受蚜虫與粉蝨之爲害。Eigenbrode *et al.*[9]發現光滑葉質之十字花科蔬菜較腊質者更抗小菜蛾。Stoner[28] 調查發現光滑葉表之花椰菜品種可減少 80% 紋白蝶及 95% 僞菜蚜之爲害。

6. 果樹類：

絨毛(pubescence)較疏之草莓品系比密生絨毛者，較少受二點葉蟎之棲息。但相反的，黑醋栗 (black currant) 絨毛密生的品種，受蟎害較輕。因此，絨毛之多寡與抗性反應，隨作物與害虫之不同而異。

抗性之生化：

比較著名之例子是由野生番茄 *L. hirsutum f. glabratum* (PI 134417)所分離鑑定之二種成分，是該野生品種抗多種害虫之主因。從其有腺細胞分泌物所含之一種非生物鹼(nonalkaloid)物質，2-tridecanone，比普通番茄品種高出許多倍，對害虫具毒害之抗生作用[9]。另一種物質爲屬於生物鹼之 α-番茄素(α-tomatine)，實驗證明，其對番茄夜蛾幼虫及寄生天敵均具毒性，α-tomatine 隨果實成熟而減少。分析發現，在野生之 PI 134417 番茄，每公斤生果含 3390 毫克之 α-tomatine ，而栽培品種僅 5 毫克。瓜類之 cucurbitacin 含量與害虫蟎之發生有關，因此，選擇該成分較低之品種，以育成對害虫具非偏好性之抗性品種。此外，在十字花科作物含之 sinigrin ，證明對桃蚜有干擾取食之作用等，均是抗虫性之生化分析研究結果。

育種方法：

抗虫育種之方法有許多，與抗病育種法相近。普通以回交法將抗虫基因從給體親(donor parent)轉移至栽培品種。有一些實例，如野生番茄 *L. hirsutum* f. *glabratum* 抗粉蝨(whitefly)之特性轉移至栽培品種上，第一次回交後代品系，除具許多番茄之園藝特性外，也同時有抗虫性。萵苣(*Lactuca*

sativa)抗葉蚜(*Nasonovia ribis nigri*)之育種，係以種間雜交(interspecific hybridization)與回交法將抗虫基因從野生萵苣(*L. virosa*)轉移而來[8]。Dickson *et al.*[7]報導以譜系法育成抗紋白蝶、擬尺蠖及小菜蛾之 NYIR 9602、9605 及 8329 等甘藍品系。McCreight *et al.*[19]以回交法將抗蚜基因自抗性親本 90234 品系轉移至具優良性狀之栽培品種上，而分別育成 AR Hale's Best Jumbo、AR5、及 AR Topmark 等三個抗蚜洋香瓜品系。對於由微效基因所控制之抗虫特性，則宜用輪迴選種方法(Recurrent selection)進行族群改良(population improvement)。Sanford and Ladd[27]以輪迴選種方法進行馬鈴薯抗馬鈴薯葉蚜之族群改良，結果經過 7 世代之輪迴選種，馬鈴薯比未選拔之族群減少 68% 之受害度。

作物抗虫研究之利用與在IPM之角色

作物抗虫研究最主要之目的在育成作物品種非但抗虫且又具高產量、高品質之特性，而欲利用抗虫品種以前，首先須瞭解其優劣點，做爲決定虫害防治方法之參考。

1. 優點：

(1)經濟：對於農民來說，唯一之花費在購買種子，而栽種一般品種，除種子花費外，尚須施藥。

(2)無危險性(nonhazardness)：與化學防治相比，並不會發生施藥時，常造成之中毒、污染環境等問題。

(3)可降低害虫密度：即使是低抗品種，仍能對害虫族群之增長有所抑制。

(4)對於棲息在該品種上之其他非標的生物個體之干擾較小：由於一般作物品種，其抗生均較專一性，故對其他益虫之影響較小。

(5)易與其他防治法相容。

2. 缺點：

(1)較耗時(time consuming)：由於與育種有關，因此往往需數年時間去育成抗虫品種，等育成時其標的害虫有可能已不具經濟重要性。

(2)因爲抗性係專一(specific)：而僅對某一種害虫具抗性，對其他害虫可能極感。

(3)抗虫品種之遺傳變異較窄：因爲抗性來源，可能僅來自單一品系而已。

(4)生物小種之問題：抗虫品種推廣後，其抗性能持續多久，視作物害虫不同而異。

而抗虫作物在虫害管理體系(IPM)中之角色，可分爲下列數種情形[10]：

1. 當作主要之害虫防治方法：
   (1)當沒有其他防治方法可用時。
   (2)不容許有任何農藥殘毒時。
   (3)當害虫或其爲害性狀難予觀測評估時。
2. 配合化學防治方法。
3. 配合生物防治方法。

參考文獻

1. Bas, N., C. Mollema, and P. Lindhout. 1992. Resistance in *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum* to the greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporarium*) increases with plant age. Euphytica 640: 189-195.
2. Bodnaryk, R. P. 1992 Leaf epicuticular wax, an antixenotic factor in *Brassicaceae* that affects the rate and pattern of feeding of flea beetles, *Phyllotreta cruciferae* (Goeze). Can. J. Plant Sci. 72: 1295-1303.
3. Bohn, G. W., A. N. Kishaba, and H. H. Toba. 1972. Mechanisms of resistance to melon aphid in a muskmelon line. HortScience 7(3): 281-282.
4. Bohn, G. W., A. N. Kishaba, J. A. Principe, and H. H. Toba. 1973. Tolerance to melon aphid in *Cucumis melo* L.. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 98: 37-40.
5. Daubeny, H. A. 1983. Insect, mite, and nematode resistance. p. 216-241. In: Methods in fruit breeding. Moore, J. N. and J. Janick (eds.), Purdue University Press, W. Lafayette, 464 pp.
6. Dickson, M. H., and C. J. Eckenrode. 1980. Breeding for resistance in cabbage and cauliflower to cabbage looper, imported cabbage worm, and diamondback moth. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 105:782-785.
7. Dickson, M. H., C. J. Eckenrode, and A. E. Blamble. 1984. NYIR 9602, NYIR 9605, and NYIR 8329 Lepidopterous pest-resistant cabbage breeding lines. HortScience 19(2): 311-312.
8. Eenink, A. H., R. Groenwold, and F. L. Dieleman. 1982. Resistance of lettuce (Lactuca) to the leaf aphid *Nasonovia ribis nigri.* 1. Transfer of resistance from *L. virosa* to *L. sativa* by interspecific crosses and selection of resistant breeding lines. Euphytica 31: 291-300.
9. Eigenbrode, S. D., and J. T. Trumble. 1993. Antibiosis to beet armyworm (*Spodoptera exigua*) in *Lycopersicon* accessions. HortScience 28(9): 932-934.
10. Eigenbrode, S. D., and J. T. Trumble. 1994. Host plant resistance to insects in integrated pest management in vegetable crops. J. Agric. Entomol. 11: 201-224.
11. Frey, R. L., and F. P. Cuthbert, Jr. 1975. Antibiosis in *Lycopersicon* to the tomato fruitworm (*Heliothis zea*). J. Amer. Soc. Hort. Sci. 100: 276-278.
12. Kalloo. 1988. Insect resistance in vegetable crops. p. 95-140. *In*: Vegetable breeding. Vol. II. edited by Kallooo, CRC press, Boca Raton, 213 pp.
13. Kennedy, G. G. 1978. Recent advances in insect resistance of vegetable and fruit crops in North America: 1966-1977. Entomol. Soc. Amer. Bull. 24: 375-384.
14. Kennedy, G. G., R. R. Farrar, and M. R. Riskallah. 1987. Induced tolerance of neonate *Heliothis zea* to host plant allelochemicals and carbaryl following incubation of eggs on foliage of *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum.* Springer-Verlag 73: 615-620.
15. King, R. R., R. P. Singh, and A. Boucher. 1987. Variation in sucrose esters from the type B glandular trichomes of certain wild potato species. Am. Potato Jour. 64: 529-534.
16. Kishaba. A. N., G. W. Bohn, and H. H. Toba. 1976. Genetic aspects of antibiosis to *Aphis gossypii*

in *Cucumis melo* from India. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 101: 557-561.

17. Lin, J., M. H. Dickson, and C. J. Eckenrode. 1984. Resistance of Brassica lines to the diamondback moth (Lepidoptera: Yponomeutidae) in the field, and inheritance of resistance. J. Econ. Entomol. 77: 1293-1296.
18. Maxwell, F. G., and P. R. Jennings. 1980 Breeding plants resistance to insects. Wiley & sons, New York, 683 pp.
19. McCreight, J. D., A. N. Kishaba, and G. W. Bohn. 1984. AR Hale's Best Jumbo, AR5, and AR Topmark: Melon aphid-resistant muskmelon breeding lines. HortScience 19: 309-310.
20. Painter. R. H. 1951. Insect resistance in crop plants. The Macmillan, Co., New York, 520 pp.
21. Painter. R. H. 1958. Resistance of plants to insects. Ann. Rev. Entomol. 3: 267-290.
22. Raman, K. V., W. M. Tingey, and P. Gregory. 1989. Potato glycoalkaloids: effect on survival and feeding behavior of the potato leafhopper. J. Econ. Entomol. 72: 337-341.
23. Reinink, K., and F. L. Dieleman. 1989. Comparison of sources of resistance to leaf aphids in lettuce. Euphytica 40: 21-29.
24. Reinink, K., F. L. Dieleman, and R. Groenwold. 1994. Inheritance of partial resistance to *Myzus persicae* in lettuce. Euphytica 80: 71-78.
25. Robinson. R. W. 1992. Genetic resistance in the Curcurbitaceae to insects and spider mites. p. 309-360. *In* : Plant breeding review Vol. 10 edited by J. Janick. Purdue University, Published by John Wily & Sons, Inc. N. Y. USA.
26. Rushell, G. E. 1978. Plant breeding for pest and disease resistance. Butterworth, London, 485 pp.
27. Sanford. L. L., and T. L. Ladd, Jr. 1987. Genetic transmission of potato leafhopper resistance from recurrent selection populations in potato *Solanum tuberosum* L. GP. *Tuberosum.* Am. Potato J. 64: 655-662.
28. Stoner, K. A. 1992. Density of imported cabbageworm (Lepidoptera: Pieridae), cabbage aphids (Homoptera: Aphididae), and flea beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) on glossy and trichome-bearing lines of *Brassica oleracea.* J. Econ. Entomol. 85: 1023-1030.
29. Tingey, W. M. 1980. Breeding for arthropod resistance in vegetable. p. 495-522. In: Biology and breeding for resistance to arthropods and pathogens in agricultural plants. edited by M. K. Harris, Texas A & M University, pp 605.

Breeding Horticultural Crops Resistant to Insect Pests

Bing-huei Chen
Taiwan Agricultural Research Institute

Abstract

The importance of horticultural crops increases along with higher consuming standard, and in order to reduce residual side-effects and provide consumers residue-free vegetables, use of resistant variety for insect pest control has been emphasized. This review text cited examples of important horticultural crops in developing resistance to insect pests; The current status in studying source of resistance, mechanisms and inheritance of resistance, interaction of resistance with crop morphology, biochemical analysis of resistance, various breeding methods, and the application of resistant variety in integrated pest management.

Key words: horticultural crops, breeding, insect resistance.

「植物保護新科技研討會」專刊
臺灣省農業試驗所特刊第57號 pp. 57-64 (1996)

木瓜輪點病毒鞘蛋白轉基因木瓜之抗病性

鄭櫻慧 葉錫東

中興大學植物病理學研究所

摘要：為了利用植物遺傳工程方式將木瓜輪點病毒(PRV)鞘蛋白(coat protein，CP)基因轉移至木瓜以產生抗病性狀，木瓜轉型作用之進行係以金剛砂製造傷口，經由*Agrobacterium tumefaciens*媒介，將GUS或PRV 5'前導序列表現的PRV鞘蛋白基因導入木瓜幼胚分化組織中，並再生成轉基因植株。經由PCR及西方漬染法分析，確定CP基因存在轉型木瓜株系中，並可表現產生PRV的鞘蛋白，計獲得包含GUS前導序列的10個株系及PRV 5'前導序列的3個株系。先以組培養技術繁殖其R_0植株，經由發根、馴化，使其在溫室生長兩個月後，進行挑戰接種，以測定其抗病性狀。實驗中以來自臺灣、夏威夷及泰國三個不同來源的PRV YK、HA及TH系統供試。接種後在溫室中觀察其結果，不表現病徵之植株再以酵素連結免疫呈色法(ELISA)及生物分析偵測是否有病毒增殖。抗病篩選得到四個抗同源PRV YK的株系：GCP 16-0、GCP 17-0、GCP 17- 1及GCP 17-3，在此四株系中，GCP 17-1及GCP 17-3對異源的PRV HA及TH系統仍有高度抗性，GCP 16-0則對異源病毒只有中度抗性，而GCP 17-0的抗病能力為系統專一性的抗病現象，只對同源病毒系統有抗病力。目前此四抗病毒株系仍繼續於隔離溫室中培養，其生長情形與一般木瓜一致。但此四株系均為雌株，以日昇之花粉授粉，果實生長情形與外觀形狀也都正常。目前GCP 17-1之R_1種子已發芽，並於溫室中栽培，再次進行抗病檢定中。由於GCP 17-1及GCP 17-3對不同來源的三個病毒系統都有極高的抗病力，其未來可望不受地區限制而能廣泛應用以防治木瓜輪點病毒。

關鍵詞：木瓜輪點病毒、鞘蛋白、木瓜。

前 言

木瓜(*Carica papaya* L.)是熱帶及亞熱帶廣為栽培的重要果樹。它是多年生半木本的雙子葉植物，生活史比一般熱帶果樹短，種植後8-10個月即可採收果實。木瓜不但是廣受喜愛的水果，也是生產木瓜酵素(papain)及其它醫藥生化成份的原料，頗具經濟價值。

木瓜在生長期間最嚴重的病害為遭受木瓜輪點病毒(papaya ringspot virus，簡稱PRV)感染。PRV自1945年在夏威夷之歐胡(Oahu)島被發現以來[10]幾乎已使世界上所有的木瓜產地均受危害。台灣自1975年最先在高雄縣的燕巢、阿蓮、大樹等地發現輪點病毒，之後在短短二、三年內摧毀全省各地大部份木瓜園。罹病木瓜在葉片上產生嵌紋及扭曲變形，在莖及葉柄產生水浸狀條斑，並在果實上引起輪點狀圓斑等病徵。罹病株的果實大減，品質變差並帶有苦味，失去經濟價值。木瓜輪點病毒屬於馬鈴薯Y群病毒(potyvirus group)，為長絲狀顆粒，大小約780×12 nm。可經由機械接種或蚜蟲傳播[20]。

防治病毒病害最有效的方法爲抗病育種。在沒有抗病基因可利用的情況下，較可行的方法是交互保護(cross protection)，交互保護作用之現象於 1929 年由 Mckinney 氏發現，即植物受一病毒感染後，對同類型病毒感染具有抗病能力，利用此一現象，可讓植物感染一種對其本身沒有影響或影響不大的輕症系統病毒，此植物即受到保護而抗同類型强病系統病毒的感染。近年來由於遺傳工程的進步，根據植物病毒交互保護的理論，藉由基因轉殖的技術，將病毒的一部份轉移至寄主植物染色體內，可達到抗病毒感染的目的。Powell-Abel[19] 先將 TMV 之鞘蛋白(coat protein, CP)基因轉移至煙草，轉基因煙草表現出抗病毒感染之能力，達到延遲發病的效果，此現象被稱之爲鞘蛋白媒介的抗性(coat protein-mediated resistance)。近年來，鞘蛋白轉基因植物在許多病毒群中皆有報告[7]。鞘蛋白媒介的抗性除了對同源性 (homologous) 病毒外，對異源 (heterologous) 病毒系統或類源相近之病毒亦有抗性，此現象稱之爲廣效的鞘蛋白媒介抗性。這些經由遺傳工程方式導入病毒基因，使轉基因植物具有抗病毒感染的能力，且有不改變作物的園藝性狀，也不增加生產成本的優點，實爲防治病毒病害的嶄新途徑。

木瓜轉基因作用之研究現況

用來作爲轉移外來基因的方法，最常見的爲農桿菌媒介的轉型作用，但因農桿菌有其寄主範圍限於雙子葉植物的缺點，因此另外發展出電孔法 (electroporation)[8]， DNA 直接吸附法[12]，此二方法可應用於原生質體之基因轉移，並且不受寄主範圍限制。而以花粉管爲DNA導入之通道[15]，注射DNA至柱頭[2] 及近年來廣爲利用的粒子槍媒介轉型作用[11]，可不受寄主範圍限制之外，也改進了原生質體不能誘導再生的關卡。粒子槍媒介之轉型作用雖有許多優點，但仍有費用昂貴且其基因轉移併入染色體而可遺傳至子代之效率偏低等缺點。 Bidney[1] 以粒子槍製造傷口，再以農桿菌感染來轉移外來基因，結果可大幅提高轉型作用之效率。

木瓜的許多組織都曾用來做爲組織培養的材料，並且再生成植株，但是除了未成熟胚之外，其它組織的效率都很低。在木瓜的轉型實驗方面，1988 年Pang 及 Sanford[18] 曾利用帶有腫瘤基因的Ti載體導入外來基因至木瓜的癒合組織，腫瘤細胞持續串生但無法再生成植株。Fitch 等人利用粒子槍媒介將 PRV HA 5-1 系統的鞘蛋白基因導入木瓜[4]，鞘蛋白基因可遺傳至子代，並篩選到一抗PRV HA系統感染之株系[6]，但爲系統專一性的抗性，只抗夏威夷HA系統而不抗其它地區分離得來的病毒系統。 Fitch 等人並於1993[5]報告利用傳統的Ti質體媒介轉移此鞘蛋白基因至植物，但耗時甚久，且經長時間的 2,4-D 處理，易導至變異而無法再生成正常植株。Yang 等人[25] 亦曾利用傳統的Ti質體媒介 GUS 基因轉移至葉柄培植體，並誘導轉型癒合組織，但效率不高且轉基因植株易生變異。綜觀前人的研究，組織培養誘導再生爲轉型木瓜之最大障礙，而誘導自未成熟胚，具有高分化能力的擬胚化組織實爲通過此一障礙的捷徑。本研究之目的即在以遺傳工程方法將 PRV 的鞘蛋白基因轉移至木瓜，以獲得抗 PRV 的轉基因木瓜，來做爲有效防治輪點病的新策略。

本省 PRV CP 基因之構築

質體 pBI 121 含有 *npt* II 基因及 *gus* 基因(clontech)，pTMD 9 則含有PRV台灣强病嵌紋系統(YK

系統) 的NIb、CP基因及 3' 端非轉譯區[22]。此二質體分別在 *gus* 基因及 CP 基因前利用定點突變產生 *Nco*I 切位，並利用 *Nco*I / *Sac*I 兩切位將 CP 基因轉殖至 pBI 121，取代 *gus* 基因，使 CP 基因獲得前導序列 (leader sequence) 及轉譯起始碼 (initiation codon) 而可轉譯出蛋白，此一構築之質體稱爲 pGCP。另一構築 p5'CP 係以PRV HA 之 5' 區域 (nt 1-347)，含有病毒的前導序列及 P1 蛋白的 97 個氨基酸[24]，置於 CP 基因之前而組成。

pGCP 及 p5'CP 分別利用三親本交配 (triparental mating) 轉移到 *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 [21]。*A. tumefaciens* 於含有 kanamycin (50 mg.l^{-1}) 及 streptomycin (100mg. l^{-1}) 之LB，培養於 28℃，36 小時，可做爲植物轉型之用。

植物轉型作用及再生

木瓜 (*Carica papaya* var. Tainung No.2) 授粉後75-90天之未成熟胚培養於含有2,4-D(2 mg .l^{-1}) 的誘導培養基[4]，培養3-4星期後之擬胚化組織即可做爲轉型作用之材料。

進行轉型作用時，先於含有金鋼砂之水中振盪產生細微傷口後，再以 *Agrobacterium* 媒介，將 *npt* II 及 CP 基因轉入木瓜細胞，再利用組織培養技術誘導再生，並經由選擇性培養基篩選，可得到轉型成功之體胚。不經轉型作用之擬胚化組織在選擇性培養基上無法生長而逐漸褐變。

培養於選擇性培養基上二至三個月後，327 個擬胚化組織再生出 52 叢體胚 (每一叢生體胚由一擬胚化組織而來)，轉型作用的效率由 0 至 72.4 %，平均爲 15.9 %。

每一單獨體胚在含有 NAA、BA 及kanamycin 的選擇性培養基培養二至四星期後會長出叢生芽體。非轉型體胚則無法發芽而白化死亡。由單一體胚而得的叢生芽體視爲一植物株系。1.0-1.5 cm 高的芽体可自叢生芽體中切下，移至 IBA 培養基做發根處理。

在含有 MS 培養液的蛭石中發根生長的轉基因木瓜植株外觀正常。經馴化後，即可移到空調溫室 (23-28℃) 培養，做進一步觀察。

轉基因木瓜之確認

木瓜染色體 DNA 的抽取依 Mettler[16] 的方法進行。每一 PCR 模板用量爲 1 mg 經 RNase A 處理之 DNA，上游引子 (primer) M0928，$^{5'}$ATTCCGGTCTGAATGAGAAGC$^{3'}$，下游引子 MO 1008，$^{5'}$GTGCATGTCTCTGTTGACAT$^{3'}$，分別對應 PRV YK 之核酸序列 9277-9296 及 10077-10096[22]。PCR 設定時間爲 94℃ 1 min，55℃ 2 min 及 72℃ 3 min，30 個循環。PCR 產物以 1% agrose 電泳分析。利用對應 CP 基因的二引子，經由 PCR 技術，可自轉基因木瓜株系 GCP 16-0，GCP 16-1，GCP 17-0，GCP 17-6 及 GCP 18-1的染色體 DNA 中放大出預期的 0.82 kb DNA 片段，但在非轉基因木瓜的染色體中，則無法放大出此一片段。

西方漬染分析利用 PRV 的抗血清偵測木瓜體內蛋白產生的情形，木瓜的葉片或癒合組織研磨於蛋白裂解緩衝液 (62.5 mM Tris-HCl, pH 7.2, 10mM EDTA, 2% SDS, 3% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol 及0.005% bromophenol blue) 中。萃取液以95 ℃ 加熱 5 min，並以低速離心去除植物殘渣萃取之蛋白以 SDS-PAGE [13] 分析後，轉移至 PVDF 濾膜 (Millipore Co.)。免疫漬染步驟依 *gus* Gene Fusion System (Clontech) 的方法進行。在轉基因木瓜株系中，GCP 16-0，GCP 16-1，GCP

17-0，GCP 17-6 及 GCP 18-1 均可偵測到與 PRV 抗血清反應之 36 kDa 蛋白。但此一蛋白則無法在非轉基因木瓜內測到。

同源的台灣病毒系統 (YK 系統) 的抗病測試

挑戰接種試驗中使用了三個不同來源的病毒系統：YK 系統從臺灣永康地區分離而得[22]。供試轉基因木瓜株系均由組織培養技術繁殖。並於空調溫室中 (23-28℃) 培養兩個月。接種原爲感染 PRV 之木瓜幼嫩葉片，以 1：20 比例研磨於冰的 0.01M 磷酸緩衝液 (pH 7.0)，以機械接種於木瓜之第三、四片開展葉片，每一葉片接種 200 μl 之感病葉片汁液。接種後之植株置於溫室中，觀察病徵發展。

轉基因木瓜 R_0 植株經由組織培養繁殖而來，發根後的植株在溫室中培養二個月後供作接種測試之用。接種後病毒在植物體內複製的情形以 ELISA 或生物分析測定。轉基因木瓜本身會因表現 CP 基因而產生鞘蛋白，但相較於病毒複製所累積的鞘蛋白，其產量太少而不足以干擾 ELISA 結果。在供試的株系中GCP 16-0，GCP 16-1，GCP 17-0，GCP 17-1，GCP 17-2，GCP 17-3，GCP 17-5，GCP 17-6， GCP 18-0 及 GCP 18-1 爲含有 *gus* 前導序列的構築，5'CP 18-1，5'CP 18-2 及 5'CP 18-4 則含有病毒本身的前導序列。接種 YK 系統十天後，非轉基因木瓜植株之葉片上產生嵌紋病徵，且其莖部出現典型的水浸狀條斑；轉基因株系中，GCP 17-2，GCP 17-5，GCP 17-6，GCP 18-0，GCP 18-1，5'CP 18-1，5'CP 18-2 及 5'CP 18-4 既沒有延遲病徵出現，也沒有減緩病徵嚴重程度。轉基因株系 GCP 16-1 則可延緩病徵表現 4-12 天。GCP 17-0 接種植株中，80% 植株延遲 4-14 天出現病徵，且病徵輕微，植株高度亦與健康植株一般；其餘 20 % 之植株不表現病徵，也偵測不到有病毒感染的跡象。GCP 16-0 的接種植株中，只有30% 表現輕微病徵且延遲發病 2-6 天。其餘 70% 植株既不表現病徵，也測不到病毒感染。GCP 17-1 及 GCP 17-3 則表現絕佳抗性，於 YK 系統接種時，全部的植株都不受感染，亦偵測不到病毒。

對異源的夏威夷 (HA) 及泰國 (TH) 病毒系統的保護效果

Fitch 等人[6] 利用弱病系統 HA 5-1 的CP 基因構築轉基因木瓜，他們得到對同源强病 HA 系統抗性極佳的轉基因木瓜株系，但此株系也和傳統的交互保護一樣，表現系統專一性的抗病現象，而不抗異源的 TH 系統及其他地區的病毒系統[26]，在我們構築的轉基因木瓜的接種試驗中，强病系統 HA 系統分離自夏威夷[9]，TH 系統分離自泰國 。GCP 16-1，GCP 17-6，GCP 18-0，GCP 18-1 及 5'CP 18-1 等株系無法延遲病徵表現，GCP 16-0，GCP 17-1 及 GCP 17-3 三株系在 10 棵接種植物中分別有4，3及 2 棵植株延持發病 0- 10 天，其於6-8 棵植株則不受到病毒感染（如圖一）。GCP 17-0 可延遲 4-8 天發病。TH 系統的接種試驗中，GCP 17-6 及 GCP 18-0 二株系沒有延遲發病的效果，GCP16-0 及 GCP 17-0 可延緩病徵表現 0-10 天不等。GCP 17-1 及 GCP 17-3 的十棵接種植物中，各有兩棵植株發病，但其餘八棵在六十天的觀察期間都沒有發病。



圖一、轉基因木瓜株系 GCP 17-1 接種病毒 PRV HA 三星期後並不發病(圖左)，非轉基因木瓜則顯現典型嚴重病徵(圖右)。

Fig. 1. Transgenic papaya line GCP 17-1 (left) did not show any symptoms 3 weeks after inoculation with PRV HA, the untransformed papaya showed severe symptoms (right).

討　論

鞘蛋白所媒介的保護作用 (coat protein-mediated protection) 已在許多轉基因植物上被證實可抵抗病毒感染[7]。和傳統的交互保護作用比較，鞘蛋白媒介的保護作用的優點包括不必特意找尋病毒的弱病系統，不須長期保存和大量繁殖接種原，避免弱病系統回變和仍對植物生長造成少許影響的困擾。並且，種植鞘蛋白轉基因木瓜既不增加農民成本，也不增加栽培手續，完全不加重農民負擔。在馬鈴薯 Y 病毒群中，也有許多病毒的鞘蛋白基因被轉入菸草或馬鈴薯等植物而有抗病能力。Fitch 等人[6] 也將 PRV HA 5-1 系統的鞘蛋白基因，利用粒子槍轉至木瓜植株，轉基因木瓜雖抗同源的夏威夷 HA 系統病毒，但對泰國的異源系統不具保護能力。他們的報告顯示所得到轉基因木瓜與傳統的交互保護一樣，只具有系統專一性的保護能力。我們構築的 PRV YK 系統鞘蛋白轉基因木瓜各株系中，對病毒感染的抗病能力亦不相同，有些株系完全不具抗病能力，部份株系表現系統專一性保護能力，但有二株系 GCP 17-1及GCP 17-3 在三個來自不同地區的強病系統接種試驗中，其對異源的夏威夷系統 (HA) 及泰國系統 (TH) ，和對同源的臺灣 (YK) 系統都有表現完全的抗病能力，不受這些強病系統的感染。

雖然包括 HA、HA5-1及 YK 系統在內的已解讀鞘蛋白核甘酸序列的 PRV 的五個病毒系統中，其鞘蛋白的相似性超過 93 %[22]，但在 Fitch 等人[6] 及本研究中，都發現鞘蛋白轉基因木瓜有系統性保護現象。但因鞘蛋白的累積並非扮演決定抗病性的主要因子，且其現象甚爲複雜，因此，鞘蛋白媒介保護現象之機制目前仍不明瞭[7]。 在本研究中，鞘蛋白轉基因木瓜的抗病能力檢測仍賴挑戰接種。經由接種篩選出的株系 GCP 17-1及GCP 17-3 因對不同地區來源的強病系統具有廣泛

的抗病能力，因此具有相當高的潛力去應用於臺灣以外的木瓜產區。

以木瓜葉柄爲材料，雖可誘導再生成體胚，但需時甚久[24]。在以葉柄材料進行*Agrobacterium*媒介轉型作用並得到轉基因木瓜耗時約 12 － 18 個月[25]。利用未成熟胚誘導擬胚化組織，並以粒子槍轉移外來基因需時 13 個月，可得到轉基因木瓜[5]。在本研究中，利用擬胚化組織爲材料，以金鋼砂製造細小傷口再以*Agrobacterium*媒介轉型作用，不但提高了轉型作用的效率，且只需時九個月，大幅縮短再生體胚所需時間，並降低了組織培養於 2,4-D 培養基所誘發的突變率。經挑戰接種獲得的四抗病毒株系仍繼續於隔離溫室中培養，其生長情形與一般木瓜一致。但此四株系均爲雌株，以日昇之花粉授粉，果實生長情形與外觀形狀也都正常。目前 GCP 17-1 之 R_1 種子已發芽，並於溫室中栽培，再次進行抗病檢定中。

在本實驗中係利用金鋼砂製造傷口，並以*Agrobacterium*媒介轉型作用，爲一簡單方便有效率的基因轉移過程，且不需粒子槍這類昂貴的儀器設備。此一轉型方法係先誘導出再生能力極强的擬胚化組織，再於其上製造細小傷口，進行轉型作用，因轉型細胞都具有極高的再生能力，可大幅縮短一般轉型細胞再生所需的時間。因此，此一轉型方法可應用於其他再生時間長的作物。

參考文獻

1. Bidney, D., Scelonge, C., Martich, J., Burrus, M., Sim, L., and Huffman, G. 1992. Microprojectile bombardment of plant tissue increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens.* Plant. Mol. Bio. 18, 301-313.
2. de la Pena, A., Lorz, H., and Schell, J. 1987. Transgenic rye plants obtained by injection DNA into young floral tillers. Nature 325, 274-276.
3. Fitch, M. M. M., and Manshardt, R. M. 1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of papaya (*Carica papaya* L.). Plant Cell Rep. 9, 320-324.
4. Fitch, M. M. M., Manshardt, R. M., Gonsalves, D., Slightom, J. L., and Sanford, J. C. 1990. Stable transformation of papaya via microprojectile bombardment. Plant Cell Rep. 9, 189-194.
5. Fitch, M. M. M., Manshardt, R. M., Gonsalves, D., and Slightom, J. L. 1993. Transgenic papaya plants from *Agrobacterium* -mediated transformation of somatic embryos. Plant Cell Rep. 12, 245-249.
6. Fitch, M. M. M., Manshardt, R. M., Gonsalves, D., Slightom, J. L., and Sanford, J. C. 1992. Virus resistant papaya plants derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus. Bio/Technology 10, 1466-1472.
7. Fitchen, J. H., and Beachy, R. N. 1993. Genetically engineered protection against viruses in transgenic plants. Annu. Rev. Microbiol. 47, 739-763.
8. Fromm, M. E., Taylor, L. P., and Walbot, V. 1986. Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. Nature 319, 791-793.
9. Gonsalves, D., and Ishii, M. 1980. Purification and serology of papaya ringspot virus. Phytopathology 70, 1028-1032.
10. Jensen, D. D. 1949. Papaya ringspot virus and its insect vector relationships. Phytopathology 39,

212-220.

11. Klein, T. M., Wolf, E. D., Wu, R., and Sanford, J. C. 1987. High-velocity microprojectiles for delivery of nucleic acids into living cells. Nature 327, 70-73.
12. Kren, F. A., Mans, R. M. W., San Slogteren, T. M. S., Hoge, J. H. C., Wullems, G. J., and Schilperoort, R. A. 1985. Structure and expression of DNA transfered to tobacco via transformation of protoplasts with Ti plasmid DNA : co-transfer of T-DNA and non-T-DNA sequences. Plant Mol. Biol. 5, 223-234.
13. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. Nature 227, 680-685.
14. Ling, K., Namba, S., Gonsalves, C., Slightom, J. L., and Gonsalves, D. 1991. Protection against detrimental effects of potyvirus infection in transgenic tobacco plants expressing the papaya ringspot virus coat protein gene. Bio/Technology 9, 752-758.
15. Luo, Z., and Wu, R. 1989. A simple method for the transformation of rice via the pollen-tube pathway. Plant Mol . Biol . Rep. 7, 69-77.
16. Mettler, I. J., Center, W. R., and Co, S. C. 1987. A simple and rapid method for minipreparation of DNA from tissue cultured plant cells. Plant Mol. Biol. Rep. 5, 346-349.
17. Mc Kinney, H. H. 1929. Mosaic diseases in the Canary Island, West Africa, and Gibraltar. J. Agric. Res. 39: 557-578.
18. Pang, S. Z., and Sanford, J. C. 1988. *Agrobacterium* -mediated gene transfer in papaya. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 113, 287-291.
19. Powell Abel, P., Nelson, R. S., De, B., Hoffman, N., Rogers, S. G., Fraley, R. T., and Beachy R. N. 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. Science 232, 738-743.
20. Purcifull, D. E., Edwardson, J. R., Hiebert, E., and Gonsalves, D. 1984. Papaya ringspot virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, No.84.
21. Rogers, S. G., Horsch, R. B., and Fraley, R. T. 1986. Gene transfer in plants: Production of transformed plants using Ti-plasmid vectors. Methods Enzymol. 118, 627-640.
22. Wang, C. H., Bau, H. J., and Yeh, S. D. 1994. Comparison of the nuclear inclusion B protein and coat protein genes of five papaya ringspot virus strains distinct in geographic origin and pathogenicity. Phytopathology 84, 1205-1210.
23. Wang, C.-H., and Yeh, S.-D. 1992. Nucleotide sequence region of severe, mild and non-papaya infecting strains of papaya ringspot virus. Arch. Virol. 127, 345-354.
24. Yang, J.-S., and Yu, C.-A. 1992. Plant regeneration from petioles of *in vitro* regenerated papaya (*Carica papaya* L.) shoots. Bot. Bull. Acad. Sin. 33, 375-381.
25. Yang, J.-S., and Yu, C.-A., Cheng, Y.-H., and Yeh, S.-D. 1995. Transgenic papaya plants from *Agrobacterium* -mediated transformation of petioles of *in vitro* propagated multishoots. Plant Cell Rep. (in press)
26. Yeh, S.-D., and Gonsalves, D. 1994. Practices and perspective of control of papaya ringspot virus

by cross protection. Adv. Dis. Vector Res. 10, 237-257.

27. Yeh, S.-D., Jan, F. -J., Chiang, C.-H., Doong, T.-J., Chen, M.-C., Chung, P.-H., and Bau, H.-J. 1992. Complete nucleotide sequence and genetic organization of papaya ringspot virus RNA. J. Gen. Virol. 73:2531-2541.

Resistance Evaluation of the Transgenic Papaya Lines Expressing the Coat Protein Gene of Papaya Ringspot Virus

Ying-Huey Cheng and Shyi-Dong Yeh

Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University

Abstract

The coat protein (CP) of a local mosaic strain of papaya ringspot vrius (PRV YK) was previously constructed in the Ti-vector for generation of transgenic papaya resistant to PRV infection. The CP gene with a GUS or the PRV leader sequence was transferred to embryogenic tissues derived from immature embryos of papaya via *Agrobacterium* -mediated transformation assisted by carborundum-wounding treatment. The presence and the expression of the transgene in the putative transgenic lines regenerated were confirmed by PCR detection and Southern blotting. R_0 plants of ten CP-transgenic lines with the GUS leader and three lines with the virus leader were established by micropropagation. The plants were challenged with three different strains of PRV originated from Taiwan (YK), Hawaii (HA), and Thailand (TH). The infection of PRV was determined by symptom observation, ELISA and bioassay. Four lines of GCP 16-0, 17-0, 17-1, and 17-3 were found to be resistant to the homologous YK strain. Among them, GCP 17-1 and 17- 3 were highly resistant to the heterologous HA and TH strains, GCP 16-0 were moderately resistant to the heterologous strain HA and GCP 17-0 was specifically resistant only to the homologous YK strain. All four lines were female and their horticultural properties were similar to the untransformed papaya. The R_1 plants of GCP 17-1 crossed with Sunrise papaya have been obtained and their resistance to PRV infection are currently evaluated under greenhouse conditions. The broad resistance in GCP 17-1 and 17-3 indicated that they have a great potential to be applied in different areas for control of the notorious PRV.

Key words: papaya ringspot virus, coat protein, papaya.

「植物保護新科技研討會」專刊
臺灣省農業試驗所特刊第57號 pp. 65-70 (1996)

怎樣作好抗稻熱病育種

吳 信 淦
中央研究院植物研究所

摘要：一地區的稻熱病通常每隔三至五年會流行一次。發病嚴重時，稻米產量的損失幾達半數。防治的方法中最經濟有效的是育成抗病品種。各稻米生產地區都有抗稻熱病品種的育成，但新品種的抗病性都面臨著被該地區新崛起的稻熱病菌小種攻破的危機。這種危機直至最近依然未曾解除。從事抗稻熱病的育種家經過長期的努力，學習到抗病育種牽涉到兩種在大自然對立的生物，即稻和稻熱病菌。因此積極地從種源庫保存的稻種中尋找抗稻熱病的基因以及利用稻判別品種檢定一地區稻熱病菌小種的分佈。國際稻熱病病圃的設立確實協助育種家獲得不少抗病育種的材料。從稻熱病菌的基礎研究得知稻熱病菌具單核，爲子囊菌，單元體期有九條染色體。最大的收穫是對稻熱病菌族群的了解。存在於一地區的稻熱病菌利用DNA指紋技術可分爲屬於該地區的若干譜系，每一譜系對少數品種有致病性且涵蓋過去所定的一或少數幾個小種。這樣分法比以小種分的要合理得多，其所依據的是DNA的編制。其次是稻熱病菌遺傳輿圖的建立、非致病性基因在遺傳輿圖上的定位以及非致病性基因的分離。對一品種專一性的非致病性基因會阻止一小種感染該品種。對一非致病性基因而言，稻品種有一相對的抗病基因。稻抗稻熱病小種的基因已可利用分子標記定位於到染色體上。持久抗病性由微效基因控制，此等基因的定位也已屬可行。抗病基因的定位是分離該基因的前奏，跟隨的是將抗病基因轉殖進入感病品種，雖則目前尚未有確實成功的報告。上述的進展將在口頭上作比較詳盡的報告，並據此對本省抗稻熱病育種做些小小的建議。

關鍵詞：稻熱病、DNA指紋、致病性、抗病。

本省稻熱病的流行與抗病育種的成效

本省稻熱病發生較嚴重的在過去1963-1974的十二年間有兩年發病面積幾乎達四分之一，發病嚴重地區產量的損失可高達40%[1]。最近十年中，除傍山的田區外，幾無稻熱病發生。抗稻熱病的育種工作，數十年來一直是稻作育種課題的一部份。主要是將具有抗性的品種(系)與栽培品種雜交，於第三、四分離世代在稻熱病統一病圃(包括旱地病圃)中篩選，所得抗病品系分送各改良場作農藝性狀的選拔。最後依高級區域試驗的數據，精選高產質優的品種。當抗親的親緣較遠時，則實施回交育種法，台粳13號就是這樣育成的。如此育成的品種，一般雖有中等以上的抗性，但不能持久。換言之，新品種在推廣之後的2-3年間就失去抗性。這種現象，也常見於生產稻米的其他國家。

新育成品種不能持久抗病的可能原因

眾所週知，抗病性可分爲直式和橫式兩種。到目前爲止，育種家所選育的大都是由直式抗病基因所提供的抗病性。所謂直式抗病基因是針對某些小種而言。如此，當一新的小種興起，原有抗病品種因不具有抗該等小種的抗病基因，於是淪爲感病品種。稻熱病菌的生理小種，以一組若干個判別品種的抗感反應判別之。構成一組判別品種的數目不同，能判別的小種數目也就不同。國際判別稻種含有八個品種，能判別256個小種[12]。本省主要小種爲IG及IH群，各別對秈、粳型的判別品種爲感病反應[1]。後者可能和本省所用的抗病親本，大都是粳型的有關。如果新育成的抗病品種具有秈型血統，則有感染秈型稻能力的小種便有機可乘，興起而取代之。歐氏認爲稻熱病菌變異很大，這是新品種不能持久抗病的原因之一；且小種的判別結果，視所用的判別品種數而言，用七個判別品種所檢定的一小種，在用八個判別品種時可能判別成爲二個小種[2]。從事抗稻熱病的育種家經過長期的努力，學習到抗病育種牽涉到兩種在大自然對立的生物，即稻和稻熱病菌。吾人對稻熱病菌遺傳知識缺乏，可能也是新品種不能持久抗病的原因之一。

近年來稻熱病菌遺傳研究的進展

稻熱病菌有性世代的發現：稻熱病菌(*Pyricularia oryzae*)向來只產生分生胞子，只行無性世代。Hebert將從禾本科指粟(*Eleusine coracana*)、垂愛草(*Eragrostis curvula*)等雜草上分離的菌株與稻株上分離的雜交，得到子囊胞子，是爲可與無性世代交替的有性世代，且稱從雜草上分離的爲*Pyricular grisea*[6]。後統一命名此兩種來源的菌株爲*Magnaporthe grisea*[21]。Kato等人證實稻熱病菌的交配型由單對基因所控制，稱爲A與a[7]。爲避免誤會爲顯隱性關係，Yoder等人改稱爲MAT1-1(相當於A)及MAT1-2(相當於a)[21]。不同交配型的菌株間雖能雜交，稔實率極低，成爲稻熱病菌遺傳研究的障礙。此障礙直到法國學者在稻株上分離到交配型爲MAT1-2的菌株(稱爲GUY 11)後才部分消除。

染色體數目和連鎖群：稻熱病菌有性世代的發現提供了觀察幼小子囊內減數分裂的可能性，日人報告減數第一分裂中期看到6個二價體[17]。Wu與Sung用指粟上分離的菌株與稻株上分離的四個小種雜交，於粗絲期及中期分別看到9對及8個二價染色體[20]。Leung與Willianus於粗絲期及肥厚期均看到6個二價體[8]。Chen使用GUY11與本地小種雜交得稔實率較高的子實體，於幼小子實體內的粗絲晚、中期及第一分裂中期均確立稻熱病菌的染色體數目爲9，N=9[3]。Romao 和Hamer利用散布於稻熱病菌染色體組DNA的重複片段作出稻熱病菌的連鎖群，且歸爲8群[13]。此與上述染色體數目爲9的結果十分近似。稻熱病菌染色體數目及連鎖群的確立是其遺傳研究的基本。

指紋分析：指紋分析是利用DNA分子標記爲探針剖析一生物族群中各個體染色體組DNA的組成[4]。Levy等人用重複片段MGR586爲探針，探測美國稻熱病菌若干小種各菌株染色體組DNA經EcoR1切後多形性環帶分布的異同。根據指紋的異同，大部份屬於不同小種的菌株可歸爲同一譜系，也有一小種的菌株可歸屬爲二譜系的。追蹤比較小種IG-1 13個菌株(此等菌株在30年間於三個州內採集得的)的指紋，其歸屬於二譜系的關係不變[10]。此結果顯示以指紋區分菌株歸屬於何一譜系相當正確，也似乎推翻了歐氏所稱稻熱病菌變異無窮的說法。指紋檢定的對象是染色體組

DNA的鹼基組成，不受氣候環境的影響。氣候環境卻免不了會影響到小種檢定時人工接種的抗感反應。哥倫比亞的115菌株曾用指紋法歸屬爲6個譜系，每譜系包含若干小種，其小種間對八個國際判別品種感反應的差異常只見於少數一個判別品種。指紋法也將31個II-1小種的菌株（對八個判別品種均爲抗反應）歸屬於譜系中[11]。菲律賓的234個菌株，可歸爲六個譜系，每譜系有3-4個小種(總計21個)。各譜系對一品種的感反應不爲逢機，抗反應則前後有一致的表現[22]。該地區的譜系組成較美國及哥倫比亞的複雜，但仍爲制定抗病育種策略時的重要數據。

和稻熱病菌病原性、致病性有關的基因：角質酶爲酯酶，能切角質的酯鍵。一般相信與眞菌的致病性有關。稻熱病菌的角質酶基因*CUT1*，已被選殖。其序列長度爲2Kb，由此DNA序列推斷的蛋白有228個氨基酸。角質酶的表現可由角質誘發。稻熱病菌染色體組中通常只有一個角質酶基因，當更多份數的角質酶基因轉殖後，角質酶的活性便大量增加。如將角質酶基因的序列破壞(插入一選擇標記基因於其序列)後轉殖篩選所得 *cut1*突變體，其角質酶的活性減低，但不完全消失。突變體 *cut1*感染效果與未轉殖的親本菌株一樣，病斑外觀及產胞數亦然，顯示 *cut1*基因不是稻熱病菌的致病性所必需[14]。

稻熱病菌在感染過程中表現的基因，被視爲與致病性有關的基因。*MPG1*便是在這樣原則下用cDNA差別篩選法選殖到的，它的mRNA在感染早期伴著吸附器形成期爲最多。基因的產物爲一小的、分泌性的嫌水蛋白分子。突變體 *mpg1*使發病延緩，吸附器的形成受阻。因此，此等嫌水性蛋白之有無可能爲致病性的重要關鍵[16]。

*SMO*基因座控制分生胞子的形狀(通常爲22 x 8 μm ，由三個細胞組成的長圓錐形)。從稻株稻熱病病斑上分離的突變體 smo 的胞子接近圓形。此圓形分生胞子與致病性的低減兩性狀呈共分離，故推測 SMO 基因座亦控制了致病性[5]。

控制寄主物種專一性的基因，*PWL2*：將兩個會感染稻的菌株(其一能感染垂愛草，另一則否)雜交，後代中感染及不感染垂愛草的各半，顯示有一對基因控制對垂愛草的感染能力。復將後代中不感染垂愛草的菌株接種於垂愛草，出現少數感病病斑，後證實爲天然突變所致。設 *PWL2*基因座上，對偶基因 *pwl2*控制對垂愛草的感染能力，則不感染垂愛草的爲 *PWL2*，後代菌株中，當 *PWL2*突變爲 *pwl2*時，則能感染垂愛草。指紋分析其DNA，證實非爲實驗材料的混雜所致。對偶基因 *PWL2*已被選殖，經轉殖獲得有對偶基因 *PWL2*的菌株，失去對垂愛草的感染能力但仍能感染稻株。故寄主物種專一性基因 *PWL2*，猶如一非致病性基因阻止另一寄主物種內若干品種的感染。*PWL2*基因的產物爲一親水性可分泌的蛋白，約16KD。突變基因 *pwl2*與 *PWL2*基因序列的差別僅爲一個鹼基被取代[15]。

Leung等人[9] 用兩感染稻株的菌株雜交，得Pos1 及 Pos2 兩個致病性基因分別對兩個稻品種(系)顯示感病反應。分析另一兩菌株的雜交組合得另兩個致病基因 pos3 及 pos4 分別對另兩個品種（系）顯示感病反應。

從禾本科雜草上分離的菌株雖可和從稻株上分離的菌株間作雜交，但稔實率低。Valent等人[18] 用能感染垂愛草，且子囊胞子高稔的菌株與能感染稻及垂愛草但子囊胞子低稔的菌株雜交，然後以能感染稻株的親本菌株爲輪迴親本回交六次，期能獲得高稔且感染稻的後代，作遺傳分析。從對不同寄主(垂愛草及稻)的病原性及對稻不同品種的致病性的分離數據推論，該雜交組合的兩親有此兩型基因的差別。第一型爲對稻的病原性基因，決定病斑的大小，由感染稻的菌株所提供。此等病原性基因不扮演感染垂愛草的角色，因兩親及所有後代菌株均能感染垂愛草。第二型爲對

稻有致病性的基因，由單一基因座控制，有此致病性基因座的菌株與稻不同品種的反應非抗即感。從該等雜交組合的遺傳分析獲得三個各對一品種而言的非致病性基因，即*Avr1-co39*，*Avr1-M201*及*Avr1-YAMO*。此等非致病性基因得自不感染稻的親本菌株。

稻對稻熱病的抗病基因

Wang等人[19]利用從一抗感兩親雜交組合所得的300多個F7重組自交系及酶切長度多形性(RFLP)分子標記，把兩個可抗五個小種的基因座定位於第四對染色體上分子標記RG498及RG788之間及第十一對染色體上的分子標記RG103A及RG16之間。至於控制橫式抗病性(病斑數目)的基因則分布在第八對染色體的10個片段上，每一片段由一個或多個RFLP分子標記所標示。過去已知的的三個直式抗病基因也落在上述10個片段中的三個。綜合上述結果顯示所用雜交組合中的抗親含有直式及橫式兩種抗病基因。

對本省抗稻熱病育種工作的建議

回顧了世界各地（包括本地）對稻熱病菌的基礎研究之後，得知稻熱病菌屬於子囊菌，有九條染色體及八個連鎖群。由此可見，稻熱病菌的變異不致雜亂無章。雖則在若干地區（如菲律賓）其變異較大，也可用DNA指紋將其歸成譜系。用一特定的DNA片段(如MGR586)，不僅可以區別何些菌株的寄主是稻，何些是雜草；且一地區內譜系的種類和各類的頻度可與另一地區內的比較其異同。此正和各地區過去採用國際判別品種判別稻熱病菌小種分布的結果一樣，但後者的正確性不如指紋法。

一地區稻熱病菌的譜系一旦確立，且逐年追蹤，所得的數據即可用以篩選當地栽培品種、保存的種源品系或其他來源的種源品系，何者具有能抗該等譜系的抗病基因。

和稻熱病菌病原性、致病性有關基因的遺傳分析結果顯示致病性是由基因控制的。致病性基因的選殖、定性和轉殖將可進一步顯示致病的機制是什麼。另一方面，抗稻熱病的基因有主效基因和微效基因，此等基因賦予稻品種的直式和橫式抗病性。抗病基因在稻連鎖群上的定位以及作出各基因在一連鎖群上與特定分子標記間關係的可能性已經確立。此使抗病育種家有直、橫兩式的抗病基因可用，且可期望育成持久性抗病品種。

一地區抗稻熱病的育種策略決定之後，如何將抗病基因納入感病的栽培品種使其抗病是育種家的本行。但由於實際上今後所謂抗病基因是用分子標記標示的DNA片段而不是基因本身，抗病基因常在某些分子標記附近或兩分子標記之間。分子標記可用電泳膠體看到其存在與否。因此，育種家需要一些技巧，以確定當選的稻株中有所需的抗病基因存在。

根據上述，爲作好本省抗稻熱病抗病育種擬作如下的建議：

1. 引進MGR586殖系，找出本省稻熱病菌譜系之分布。
2. 以稻的分子標記標示對本省稻熱病菌主要譜系的抗病基因，包括直式的和橫式的抗病基因。
3. 分離需求的抗病基因並轉殖於感病的栽培品種。或利用雜交、回交育種法，但在適當的分離世代利用分子標記的標示篩選具有需求的抗病基因的品系。
4. 鼓勵從事植病、遺傳及育種工作者三方面的合作。

參考文獻

1. 吳信淦、陳正次、謝維德、王玉斌。1976。加强臺灣省稻熱病防治的建議。總統蔣公逝世週年紀念論文集。445-462。
2. 歐世璜。1971。抗稻熱病育種的新途徑；邱人璋編稻作病害：31-48。(水稻病害討論會彙刊農村復興委員會，台北9月9-12日，1969)。
3. 陳儀容。1993。稻熱病菌染色體組的編制。國立台灣大學農藝研究所論文。pp68。
4. Caetano-Anolles, G., Bassam, B. J., and Gresshoff, P. M. 1992. Primer-template interactiona during DNA amplification fingerprinting with single arbitrary oligonucleotides. Mol. Gen. Genet. ,235:157-165
5. Hamer, J. E., and Givan, S. Genetic mapping with dispersed repeated sequence in the rice blast fungus: Mapping the SMO locus. Mol. Gen. Genet. 223:487-495.
6. Hebert, T. 1971. The perfect stage of *Pyricularia grisea.* Phytopathology 61:83-87.
7. Kato, H., Yamaguchi, T., and Nishihara, N. 1976. The perfect state of *Pyricularia orzae* Cav. in culture. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 48:507-510.
8. Leung, H., and Williams, P.H. 1987. Nuclear division and chromosome behavior during meiosis and ascosporogenesis in *Pyricularia oryzae.* Can. J. Bot. 65:112-123.
9. Leung, H. Borromeo, E.S. Bernardo, M.A., and Notteghem, J.L. 1988. Genetic analysis of viru lence in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea.* Phytopathology 78:1227-1233.
10. Levy, M., Romeo, J., Marchetti, M. A., and Hamer, J. E. 1991. DNA fingerprinting with a dispersed repeated sequence resolves pathotype diversity in the rice blast fungus. Plant Cell 3: 95-102
11. Levy, M., Correa-Victoria, F.J. Zeigler, R.S. Xu, S., and Hamer, J.E. 1993. Genetic diversity of the rice blast fungus in a disease nursery in Colombia. Phytopathology 83:1427-1433.
12. Ling, K.C. 1968. Standardization of the international race number of *Piricularia oryzae* Cav. (Mimeograph, IRRI).
13. Romao, J., and Hamer, J.E. 1992. Genetic organization of a rpeated DNA sequence family in the rice blast fungus. PNAS 89:5316-5320.
14. Sweigard, J.A., Chumley, F.G., and Valent, B. 1992. Cloning and analysis of CUT1, a cutinases gene from *Magnaporthe grisea.* Mol. Gen. Gent. 232:174-182.
15. Sweigard, J.A., Carroll, A.M., Kang, S., Farrall, L., Chumley, F.G., and Valent, B. 1995. Identification, cloning, and characterization of PWL2, a gene for host species specificity in the rice blast fungus. The Plant Cell 7:1221-1233.
16. Talbot, M.J., Ebbole, D.J., and Hamer, J. E. 1993. Identification and characterization of MPG 1, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea.* Plant Cell 5: 1575-1590.
17. Tanaka, J., Murata, N., and Kato, H. 1979. Behavior of nucleic and chromosomes during ascus development in the mating between either rice strain or weeping lovergrass strain and ragi

strain of Pyricularia. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 45:182-191.

18. Valent, B., Farrall, L., and Chumley, F. G. 1991. *Magnaporthe grisea* genes for pathogenicity and virulence identified through a series of backcrosses. Genetics 127:87-101.
19. Wang, G. L., Mackill, D. J., Bonman, J. M., McCouch, S. R. Champoux, M. C., and Nelson, R. J. 1994. RFLP Mapping of genes cconferring complete and partial resistance to blast in a durably ,resistant rice cultivar. Genetics 136:1421-1434.
20. Wu, H.K. and Sung, S.L. 1984. Chromosomes in rice blast fungus. Bot. Bull. Acad. Sini. 25:219 -227.
21. Yoder, O. C., Valent, B. and Chumley, F. 1986. Genetic nomenclature and practice for plant pathogenic fungi. Phytopathology 76:383-385.
22. Zeigler, R. S., Cuoc, L. X., Scott, R. P., Bernardo, M. A., Chen, D. H., Valent, B., and Nelson, R. J. 1995. The relationship between lineage and virulence in *Pyricularia grisea* in the Philippines. Phytopathology 85:443-451.

How to Improve Rice Blast Resistance in Taiwan

Hsin-Kan Wu

Institute of Botany, Academia Sinica

Abstract

After reviewing the achievements of rice breeding in the past several decades, the author found that it was very successful in high yield but not in blast resistance. The failure in getting persistent resistance may be attriblutes to the lack of generic information of the blast fungus, *Magnaporthe grisea.* In the recent years, however, this bottleneck has been partially removed. Genetical studies reveal that the fungus has genes of pathogenicity as well as virulence. Virulence related genes (MPG1, SMO) have been cloned and characterized. Molecular markers were used in finger-printing blast field isolates into lineage group. It would be very optimistic in obtaining better resistance if our rice breeders are encouraged to indulge collaboratively with geneticists and pathologists in tagging genens resistant to the local assorted virulent genes and identifying their presence in the improved rice varieties.

Key words: rice blast resistance, pathogenicity, finger printing.

「植物保護新科技研討會」專刊
臺灣省農業試驗所特刊第57號 pp. 71-86 (1996)

昆蟲抗藥性研究的回顧與展望

馬 堪 津
中央研究院動物研究所

摘要：本文簡要地介紹了自第二次世界大戰以來，殺蟲劑的研究趨勢。它包括了殺蟲劑的更替及其相關研究，即毒理機制、昆蟲抗藥性之發生及偵檢、遺傳生化與抗性演化及抗性害蟲管理的大趨勢。本文主要以桃蚜及諸害蟲之抗性機制研究爲例，陳述由致死率到遺傳分子生物學的研究方向乃是實驗或理論工作之著眼處，而研究結果必須印證田間害蟲抗性基因表現之調控及抗性族群演化發生之態勢，纔能對症下藥、擬定策略、到落實田間害蟲管理工作。

關鍵詞：殺蟲劑、抗藥性、檢測、遺傳、抗性管理。

前 言

半個世紀以來，以農藥防治害蟲之效率評估，是循著三個層面進行界定，而逐步展開來的。它們是(一)農藥本身的理化，生物特性及其對環境、人畜所造成衝突的評估，(二)農藥對害蟲的致毒機制，(三)害蟲對農藥所演發的抗藥性機制。第一個層面的研究趨勢是將農藥的副作用如其殘效性、安定性、致病(癌)性，廣效性由繁雜解降爲簡單，不會污染環境，但卻是專一性高而且合乎生物理化性之殺蟲劑。第二個層面的研究則是由複雜的結果中逐一找出簡單的原因；包括毒效檢定、族群生理及生化之差異性、標的器官致毒，一直到細胞分子生物學呈現之現象之檢查。第三個層面研究，亦是趨向由繁入簡地找出抗藥性的機制所在。是經由族群異質體之確認、生化遺傳因子之分析、生化及免疫生化與探針諸法用之於速測、利用分子生物技術進行抗性基因之檢定，到轉殖基因用於抗蟲。三個層面研究中，以第三者所獲資料，結果最詳實。然而在抗藥性害蟲個體抗性機制表現的調控上，和害蟲族群遺傳變異發生的演化上，仍然所知有限；加上第二個層面，如昆蟲神經及內分泌致毒研究之進展緩慢，配合不及，而導致三個研究層面產生關係脫節，致使第三個研究層面之基礎研究所獲結果無法切題地落實在田間的害蟲防治的應用上。

十年前，國內許多學者曾聚集在一起，就農藥之使用、有害生物之抗性、害蟲之再猖獗、抗性昆蟲之族群遺傳等課題作了類別的專文介紹[3]，獲得了社會正面的回響。匆匆間，十年過去。本著鑑往知來的情懷，本文在此簡單地介紹了過去五十年間殺蟲劑研究發展的沿革，其中函蓋了(一)殺蟲劑致毒機制之探討，(二)昆蟲對殺蟲劑產生抗性不同機制之生化遺傳研究結果，(三)抗藥性的檢測及其應用於田間抗性害蟲之監測及(四)害蟲抗藥性管理到害蟲防治的考量。在技術層面上，由過去實驗室的生物檢測、生化及電生理檢測到目前生化免疫及生物技術施用於田間快速偵測的應用上也作了討論。如此，是期望能建議有關當局，及時重視延緩田間抗藥性害蟲發生之前的先期基礎科學研究工作，把傳統上僅注意致死率及劑量的檢測結果，輔以抗性遺傳演化及族

群生態諸相關研究上所得的結果，應用在控制抗藥性害蟲族群之發生上，以期能落實抗藥性害蟲田間防治的永續經營。

殺蟲劑研發背景的概況

在二次世界大戰末期，原來設計用來殺人的化學合成神經性毒殺劑，因緣際會地被使用於公共衛生害蟲的防除上，並且收到了極好的結果。從此以後一系列的化學合成的所謂第二代殺蟲劑便被廣泛地開發、研究、製造、使用，完全地取代了以植物性、礦物性爲本的第一代殺蟲劑，迄今已超過半個世紀。半世紀以前由於吾人對於殺蟲劑毒理學的檢驗要求並不周嚴，故而對農藥的選擇是以容易合成、價廉、有毒效爲認定標準。因此在50年代藥效甚佳的諸多有機氯劑及少數的有機磷劑逐漸地取代了礦物性殺蟲劑，而大行其道。雖然當時也針對合成藥劑的毒性、毒理作過探討，但因爲沒有作長期而深入地追蹤研究，而致於疏忽了它們長時期的殘毒效應[9]。至於施用殺蟲劑之後,對人、畜、野生生物、自然環境造成的衝擊，及其所留下的後遺症，一直未予以正視，直到60年代初美國的 Richard Carson 氏發表〝寂靜的春天〞一書[14]以後，方引起社會大眾的重視。而產、官、學界的負責人纔開始就濫用殺蟲劑所須付出社會成本之事，作出了認眞的檢討。

殘餘毒效(residue)、昆蟲抗藥性 (resistance) 及次級害蟲的猖獗 (resurgence) 三個主要問題同時浮出檯面[10,11,28]。隨人們對殘效性期長、生物濃度集中(bioconcentration)，危及人、畜、野生生物的有機氯劑的强力譴責，有機氯劑終告全面禁用，同時，有機汞劑、砷劑也遭到禁用。跟著，具有選擇性殺蟲特性的有機磷劑、氨基甲酸鹽劑則取而代之地用上。這些帶有酯(Ester)的化合物，易爲溫血動物之酯解酵素分解，且易於在環境中崩解而大量被開發、使用。卻也因多種昆蟲具高活性的解毒酵素或低敏感的膽鹼酯解酵素，致使害蟲產生高度的抗藥性，對害蟲防治又成爲棘手的問題[39]，而新型殺蟲劑的殷切需求勢所難免。有鑑於此，60年代的昆蟲學家極力在生理學研究的範圍內用 "以其人之道，還治其人之身"的理念，開拓出了一片生理性毒殺劑(biorational pesticide) 的毒理天地，促成了七零年代第三代殺蟲劑，也就是昆蟲生長調節劑(insect growth regulators) 的問世[60]。這些調節劑像有機磷、氨基甲酸鹽、合成除蟲菊精一般都帶有酯，也都會被昆蟲體內的解毒酵素代謝，卻因爲具有專一性，故乃能用於環境害蟲的防治。這一類的殺蟲劑是不會引起殘餘毒效及次級害蟲再猖獗的問題，然而昆蟲抗藥性的問題，隨著第三代殺蟲劑的頻繁使用，又重新浮現[17,35,56]。其原因在於吾人對殺蟲劑與標的物兩種分子之結合所引起之變化噩然無知，對兩種分子結合後所導致的生理影響也不是很清楚，一俟害蟲之抗性機制發生時，如定點突變(point mutation)，就不知到該如何應變，而使辛苦開發出來的殺蟲劑失去效用，故思考新的殺蟲劑的使用必須重視殺蟲劑致毒的專一性及分子作用的特殊性。以利於對害蟲抗性機制發生時有足夠的認知而能採取適當之應變，如改變殺蟲劑之分子結構，剋制抗性之發生。

爲了避免因害蟲抗藥性頻頻發生而導致"無藥可用"的窘境，一方面人們不斷地嚐試著去開發對害蟲致毒機制完全不同的新農藥，另一方面人們也開始檢討往日以化學防治爲上綱的蟲害防治法，而重新思考利用天敵、抗蟲育種、除草清園、改變種植方法及習慣等綜合性的蟲害防治方法(integrated pest control)，以減輕蟲害產生抗藥性的壓力，在田間慣用的防治方法也由撲滅害蟲的策略調整爲害蟲管理(integrated pest management) 的策略[51]。人們對農藥的使用比以往更注意其時效性，將農藥當作一個防治策略的手段，而非終一的目標。70年代之後，改良後的合成除蟲菊

精、細菌毒素 (bacterial toxin)、多角體病毒(polyhedron virus toxin)、微生物毒素(avermectin) 等都被昆蟲學家或藥理學家開發爲生理性殺蟲劑，而昆蟲費洛蒙(insect pheromone) 的研究也吸引了昆蟲生理學家的興趣，從而競相投入研究。

人類發明了抗生素(antibiotics) 防治了許多可怕的細菌性傳染病，也發明了合成農藥撲滅了許多農業及衛生害蟲，然而就像細菌會對一代又一代的抗生素產生抗性，同樣地，昆蟲對一代又一代的殺蟲劑也一再表現出頑强的抗藥性，就人類開發出來的細菌抗生素而言，已是第六代了，昆蟲毒殺劑到底又能開發出幾代? 抗生素的研發是循著一定的步驟展開的，殺蟲劑的開發是不是也可以循著同樣的方法展開呢? 這兒，我們先檢視一下，過去五十年來，吾人對殺蟲劑本身、致毒性及害蟲抗藥性三個層面的研究曾經獲得了多少的認知，在不同層次的研究結果上，有多少認知是可以相輔相成，實驗室內所獲得的知識如何轉化爲田間實施之功，理論上的探討怎麼在執行時落實爲用?

殺蟲劑致毒機制的簡介

所謂第二代的合成有機毒殺劑可分爲五類[36]：1.有機磷劑(如大淨農、馬拉松)。2.氨基甲酸鹽劑 (如加保利、好年冬)。3.滴滴梯(DDT)及大克蟎。4.環二烯(如飛佈達、地特靈)。5.合成除蟲菊精(如百滅靈、芬化利)。都會對神經系統造成毒害。前兩類會干擾神經聯會間傳遞的乙醯膽鹼酯的正常代謝。環二烯作用於GABA接受器所及之氯離子通道，會促進乙醯膽鹼酯之釋放而干擾到神經傳導。滴滴梯及合成除蟲菊精會作用於神經細胞膜上的鈉離子通道之開合[50]。基本上，它們的致毒機制，就神經生物學及分子生物學層次的了解，尚在作深一層的探究中。

第三代殺蟲劑是所謂的生理性殺蟲劑，其中主要包括了生長調節劑類似物，而以類青春激素(juvenoids)及機丁質抑制劑 (chitin synthetase inhibitors)爲主[18]，也包括了抗青春激素化合物(anti-juvenile hormones)，和其它對昆蟲生長有干擾的化合物。這些昆蟲生長調節劑之致毒機制簡述如下：類青春激素能阻礙昆蟲的變態、生殖及胚胎發育。機丁質抑制劑能阻礙昆蟲新表皮之生成，而抗青春激素化合物則可致咽喉側腺細胞死亡，達到催化幼蟲早熟而致死[54]。除了昆蟲生長調節劑之外，具有生理性殺蟲劑特性的微生物製劑，被研究開發的有蘇力菌(*Bacillus thuringiensis*)所產生的毒素(δ -endotoxin)爲著。其致毒機制在於毒素蛋白鏈在昆蟲腸壁細胞形成一通道，使鉀、鈉、胺離子能自由出入，使腸壁細胞中負責吸收的微管毀損，導致細胞崩析(cell lysis)。其他如昆蟲桿狀病毒 (insect baculovirus) 中之核多角體桿狀病毒 (nuclear polyhedrolysis virus)、昆蟲寄生眞菌(entomopathogenic fungi) 之白、黑、綠疆菌也都實際上用於田間害蟲防治，但致毒機制尚待研究中。上述三種生物製劑，雖然前景看好，且已有外用製成藥劑，直接噴灑施用；也有內用，如將桿狀菌毒素轉植於植物體內，以行抗蟲之實。因爲上述諸殺蟲機制涉及大分子(macromolecule)的病理作用(pathology)，不概括於本文所言及的合成殺蟲劑的範圍內，故在本文不作敘述。第三代殺蟲劑異於第二代者，就田間效應而言有二：1.是差別在於害蟲致死的快慢，2.是前者不會危及天敵的生存，比較上來說，前者較有利於綜合防治管理的實施，且對環境、人、畜無害，應是較佳的選擇[43]。

以上所述是涉及殺蟲劑對昆蟲在生理生化上所呈現的致毒機制。另一個更基礎的致毒機制的研究層次是涉及殺蟲劑分子結構中離子或基或根與生物大分子之結合。其結合情形之穩定與否會

導致生物體表現在生理生化上的致毒輕重。吾人希望以殺蟲劑的化學結構及其相應的物理化學性質，來推論殺蟲劑其生物致毒性的分析方法。這個方法簡稱爲 QSAR 分析法(quantitative structure activity relationship)。QSAR 法的理論根據就是依殺蟲劑主要致毒特性，包括化學反應能力、穿透力、移轉能力及作用於標的蛋白質的能力而予以定量[6,36]。QSAR 分析法，以Hansch-Fujita的多參數法如電子效應參數、立體參數及分配參數三個理化參數來定殺蟲劑之藥效。如在同一系列的殺蟲劑化合物，改變取代基 (substitute group) 時，往往能作出較正確的預測。例如在有機磷劑對乙醯膽鹼酯酵素作用中，兩者的離與合各有一反應常數，兩常數之比率，即離除以合就是解離常數(Kd)。兩分子合後生成之物，進一步形成酵素乙醯化的反應常數(Kp)，後者與前者兩個常數的比值 (Kp/Kd)，是整個雙分子抑制常數(Ki)。解離常數(Kd)是測量有機磷殺蟲劑與酵素的結合能力，應該與其結構的分子有關。馬拉松的磷原子之正電荷密度爲0.204，對氧馬拉松爲0.452，特普(vapotone: TEPP)是0.434。這些電荷密度表現出農藥與酵素結合力，即毒性，是特普大於對氧馬拉，更大於馬拉松。此例說明了殺蟲劑的抑制機制是由於一個親核中心，在作用部份被親電子的磷原子所攻擊，解離一個脫離基(leaving group) 而使酵素被乙醯化。同樣類型的有機磷殺蟲劑及安基甲酸鹽劑的致毒性皆可以依此類推，即是用增加正電荷密度於磷或碳原子上，達到增加這兩類殺蟲劑的致毒性[6]。

另一個例子，DDT 及其類似物的分子其立體結構能否與受體(在神經細胞膜上)空間配合爲主要致毒機制。DDT 以其楔形基部吸附到神經細胞軸膜的蛋白部份，其頂端則打開鈉離子通道，干擾神經軸的傳導。此涉及了反應分子的立體參數。QSAR分析法，以 Hansch-Fujita二氏法應用廣泛，它提供了一個新方法來預測新化合物的取代效應，估算殺蟲劑致毒性的主要作用是否繫於化學反應能力，或其它參數，是未來探究新殺蟲劑分子結構應如何架構之最有效途徑。此分析法可以省略以往漫無章法大量篩選化合物所造成的經費與時間的浪費。利用量子化學著手來研發農藥，將爲下一世紀開發殺蟲劑的研究走向[6,36]。

昆蟲抗藥性機制的簡介

昆蟲抗藥機制(resistance mechanism) 的研究是害蟲防治應用的基礎，也是對藥劑防治失效前預先所作"知其然"的評估，爲的是消極地延續吾人開發出來的殺蟲劑的使用壽命，以避免農藥無處不在，而抗性也無處不在的情形發生。昆蟲抗藥性機制可略分爲二類，即：行爲性的及生理性的抗性機制。前者研究昆蟲如何在不接觸到殺蟲劑之前，就能偵測到殺蟲劑的存在而逃離。此機制，可以想見是與昆蟲嗅覺或化學接受神經系統之作用有關，目前尚不明瞭。昆蟲生理抗性機制的研究範圍主要包括：1. 藥劑穿透表皮的延緩，2.代謝殺蟲劑功能之增強，3.作用標的或神經對藥劑敏感性之降低及4.殺蟲劑的被吸附。依照 Mullin及Scott 二氏[36]歸納 Carino 及 Feyereisen 就近年來有關昆蟲抗藥性在分子生物層次研究所得，界定了分子生物學的抗藥性機制概括於三個主要項目之下。它們是1.結構基因之改變、2. 基因重覆之表現及3. 基因表現之改變，而與一個調節基因控制所有解毒酵素之結構基因之假說[44]，無明確的關聯。以下僅就三類昆蟲生理抗藥性機制作概略地介紹。

穿透及吸附：殺蟲劑穿透表皮的減緩及殺蟲劑在進入蟲體後的被吸附，多與殺蟲劑本身的非極性有關。前項因子如單獨存在，其所扮演的抗藥性角色即不大，如果穿透因子同時與其他代謝

性抗性因子或不敏感性因子並存時，則有强化抗性機制之表現[34]。吸附因子，或與許多高等動物血液中具非極性特性之蛋白質分子之胜肽鍵，能强力結合外來同爲非極性之分子，而產生稀釋農藥的作用而減少了致毒的可能性。有關這方面的昆蟲之分子機制上的資料，尙待查證。

代謝功能之增強：分解油溶性的殺蟲劑成爲親水性或水溶性高而可排遺於體外的代謝機制是解毒的重要過程。參與解毒的酵素主要有單氧酵素、轉基酵素及酯解酵素，已知的資料顯示抗藥性家蠅或果蠅單氧酵素活性高[29,53]，與抗性直接相關，它涉及家蠅第二條染色體上或果蠅第三條染色體上該酵素調節基因 (regulatory gene) 的改變。在刺吸式口器的昆蟲，如桃蚜及一種熱帶家蚊，則涉及了相關酯解酵素第四號及B1相應的去氧核醣核酸 (DNA) 的複製(amplification)。這兩種一爲結構基因之增多，一爲調節基因之適應而使酵素之增多，致使昆蟲抗性增强，導致藥劑防治失色。麥胱甘肽轉基酵素爲昆蟲體內重要的分解有機磷殺蟲劑的酵素。抗性家蠅的轉基酵素活性之增强涉及了增生的 (amplified) 去氧核醣核酸序列(DNA-sequence)，這種現像尙未見於感性家蠅[32]。轉基酵素可以被誘發，誘發之轉基酵素較嗜與3,4- Dicholoro-nitrobenzene (DCNB) 形成共軛產物，而少與 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)相作用。抗性家蠅誘發之轉基酵素也較嗜與大淨農的O-去烷基行成共軛[62]。具有抗乙基或甲基巴拉松及對氧巴拉松之小菜蛾族群上也發現，其嗜與DCNB 作用的同功異構酵素，在感性小菜蛾上則不多見[30]。

敏感性之降低：依殺蟲劑作用機制之不同，又可分爲五類:1.由DDT及類除蟲菊對鈉離子通道之影響所致之擊倒作用(knockdown effect)，在抗藥性的家蠅身上發現是由於相關的結構基因起了改變而致使對殺蟲劑不敏感。2.昆蟲乙醯膽鹼酯解酵素對有機磷劑及安基甲酸鹽劑的不敏感，也是因爲結構基因改變的緣故。3.昆蟲神經脈衝之抑制性傳遞物質GABA 接受器對環二烯之不敏感，也可能是由於同樣的原因所致。4.青春激素及細菌性毒素的接受器對青春激素或毒素之反應不敏感情況，也可能是緣於同一原因。目前尙待進一步的證實[36]。

昆蟲抗藥性機制的檢定

不論是昆蟲抗藥性機制的研究，或是檢定方法之確立，基本上都是沿著分析技術及方法的改進愈趨精確。然而每一個檢定方法都有理論上與應用上不能完全符合的誤差存在，而每一種檢定方法在應用上也都有其特殊的瓶頸[12]。抗性機制的檢定可由早期致死率百分之五十之劑量(LD_{50})之檢測、協力劑試驗、放射性標記農藥在活體內之代謝分析、生物化學及電生理、免疫生物化學到近期的分子生物技術運用之檢測。此其間，反映出檢測方法愈專注、結果亦愈精確、省時，但是相對的，適用之範圍亦愈小。然而，每個步驟都有其研究的必要性，各種研究結果可以彼此相互爲用，來闡明抗性機制，而予以合理的解說。

劑量－死亡率曲線之檢定

早期在還沒有訂立標準的實驗方法之前，殺蟲劑毒效的測定，只在於取得半數致死劑量(LD_{50})，或劑量-死亡率曲線(dosage-mortality curves)等資料。不同實驗室之間所得資料因施藥方式不同，彼此間難以比對。在1944及1952年間 Finney氏利用機率分析法 (probit analysis)，將致死率、劑量間之關係作分析方法之界定[24]。而世界衛生組織(WHO)及世界糧農組織 (FAO)分別立下標準檢驗法以檢驗各種衛生及農業害蟲對殺蟲劑忍受性(susceptibility)的高低。劑量對數--機率曲線 (ld-p line: Log dosage-probit line) 分析法，不僅可以測出供試昆蟲的感藥的高低，更可由曲

線斜度的大小，判定昆蟲族群的同質或異質性、昆蟲族群的抗藥性因子是單因子或多因子質、抗藥性在遺傳上的顯隱性及抗性是否涉及性聯遺傳[58,59]。此法，就檢定毒效、昆蟲感受性而言，有其重要性，目前仍廣泛地被使用著。

再一方面，利用對酵素具有抑制作用 (inhibition) 的協力劑 (synergists) 作協力劑毒效檢驗 (synergistic test)，也是殺蟲劑毒理學家常用的實驗法。協力劑與殺蟲劑之併用以行劑量--機率曲線實驗，可以快速地推論出昆蟲是否基於標的不敏感抑或基於某種解毒酵素之活性昇高而導致抗藥性。目前已肯定 piperonyl butoxide (PB)能抑制單氧酵素，S.S.S-tributyl phosphorotrithioate 能抑制水解酵素；4,4'-dichloro-1-methylbenzhydrol 能抑制 DDT 轉基酵素。此外也有各種協力劑作用於不同解毒酵素之抑制也爲學界認可，但並無明確定論[36]。就最有名的單氧酵素抑制劑Pb 而言，它卻是無法對不同的 P450蛋白質表現的活性作相同程度的抑制。反過來說，單以Pb所抑制P450活性的大小來判斷害蟲體內特定單氧酵素活性之大小，也會導致以普遍性取代專一性結果的誤判[22]。

活體殺蟲劑之代謝檢定

將含特定放射性元素標記的殺蟲劑直接施於昆蟲體表，經不同時間粹取及定量、定性分析殺蟲劑及其代謝物，如配合協力劑之使用更易判定何種解毒酵素可能參與代謝。此法之缺點，則在於殺蟲劑滲透及排遺如何影響劑量之致毒，須另行設計實驗，事先進行評估，因此代謝之速率評量不易[42]。

上述的兩類檢定法是以昆蟲的活體來進行實驗 (*In vivo* study) 有一定的優缺點。下述的兩種檢驗法卻是以試管實驗 (*In vitro* study) 爲基礎。試管實驗可以補助活體實驗之不足，且相輔相成[50]。試管實驗是以用昆蟲的組織、細胞或功能蛋白質如酵素、接受器等作直接的生化或電生理檢定以判斷那種因子是主要抗性機制，其方法之應用早在60年代被肯定[57]。

生物化學反應及生物物理反應之抗藥性檢定

劑量和死亡率曲線所提供的資料是無法肯定昆蟲抗性所涉及之諸項生化抗性機制[57]，是以生物化學及生物物理反應的測定法就成爲抗性因子主要的鑑定方法。以生化法測定昆蟲抗藥性是循著兩個方面來進行。第一個項目是包括：1.測定有多少種酵素參與抗性，2.它們的生化特性如何？這其中包括了酵素之量變多，與酵素之質變利。前者如刺吸式口器昆蟲，多屬酵素量變多而致抗性[37]，後者抗有機磷劑之家蠅酯解酵素之質變，導致酵素之量雖少但分解殺蟲劑卻更快而呈抗性[41]。第二個項目是指測定所謂標的酵素或受器 (binding site, receptor) 的質變，而導致對殺蟲劑的抑制作用不敏感。其法是以電生理法偵測神經細胞膜電位差，在受刺激後改變的大小及去極化電位緊張或鬆弛的時間來作定奪。目前所知標的不敏感的情形，一則是發生在神經突觸 (dendrite) 之間，即傳導物質乙醯膽鹼的酯解酵素 (acetylcholine esterase) 被抑制的程度會因酵素的質變而減低，造成抗藥性。二則是神經軸突(axon) 上細胞膜可能涉及擊倒因子(Kdr) 之鈉離子的結合位對於DDT或除蟲菊之敏感性減低[13,21]。或 γ -Aminobutyric acid(GABA) 受器上結合位對環二烯等有機氯劑的敏感降低。彼等抗性機制皆非協力劑所能作用到[52]。GABA受質之降低敏感度及擊倒因子變因引起抗性之偵測，必須藉電生理之法行之，除非以類似單元抗體或核酸探針之檢驗法可以落實，否則無法將它實際應用到田間速測。

就生化遺傳學的概念來說，以往的一個基因一個蛋白質的觀念多少都被認定爲事實，然而，

隨著生化、遺傳分子學的發展，現在知道一個基因座(locus)上可以有二至數個表現或不表現的相同位基因(alleles)[38,40]存在，也知道不同的同功異構酵素 (isozymes) 所屬的基因可能在基本上並不相同，呈現了更複雜的蛋白質與基因座的關係[37,47]。故僅藉著一般性受質 (general substrate) 作生化反應，概括地測定解毒酵素活性的結果，往往並不能彰顯昆蟲體內眞正參與的解毒酵素之特性。在小菜蛾抗性生化的測定上，我們利用Naphthyl acetate 反應，求出酯解酵素的活性。但是所測出之活性，大多與泳動得較快的異構酵素較有關，這些異構酵素卻不能分解 Malaoxon，反而泳動較慢能分解 Malaoxon 的異構酵素，才是直接涉及抗 Malathion之强弱。是以選擇出一個具有專屬代表性的受質，用以測定昆蟲體內特定解毒酵素之活性，是來日研究應注意的細節 (Maa, unpublished data)。例如專家建議以Naphthyl butyrate或Methyl butyrate以取代 Naphthyl acetate，用來測定桃蚜或者一種熱帶家蚊體內羧基酯水解酵素(carboxylester hydrolase)的活性[15]。

以昆蟲的麥胱甘肽－硫－轉基酵素(glutathione *S*-transferase) 而言，其同功異構酵素也是形色各異，僅就秋夜盜蟲幼蟲 (*Spodoptera frugiperda* Smith) 的中腸和脂肪體而言，就已發現有六種同功異構酵素[61]。有些昆蟲轉基酵素會被特定的誘發劑(inducer) 誘發，而抗藥性昆蟲，其體內高計量的酵素活性與專屬的訊息核醣核酸計量之昇高有關[33]，由此推知，用傳統的一般性受質如DCNB或CDNB所測出轉基酵素的活性，是否能代表昆蟲抗藥性相關而專屬的轉基酵素活性，就顯得難以論斷。就小菜蛾抗有機磷劑的研究而言，直接以有機磷劑爲受質，偵測抗藥性及感藥性族群中各轉基酵素的活性，並藉以找出有代表性的受質，如DCNB，作抗藥性族群轉基酵素活性的偵測，是較具說服力的[30]。

以分子遺傳學作單氧酵素 (monooxygenase) 之細胞色素P450與昆蟲抗藥性之探究而言，生化法所測昆蟲抗性品種，必與高計量P450蛋白質含量、高單氧酵素活性相關，且其吸光光譜，在抗性者也異於感性者[22,47]。在另一方面，Konno等氏卻測得所有P450活性之總和的高低並不能代表某些負有和抗性有關特殊P450之活性[32]。其實，就氧化過程之去硫作用中(磷-硫酯氧化爲磷酯) 活性降低的事實而言，確證"某一類"龐雜酵素的總活性，並不能代表其中"某一種"特定酵素的活性的事實。

昆蟲乙醯膽鹼酯解酵素，對有機磷的不敏感是眾所週知的。分子生物學上的殺蟲劑抗性機制研究明顯地顯示，不同種昆蟲族群其膽鹼酯解酵素呈現彼此不同的突變。這一類介於敏感性及抗性蟲在分子層次上的突變，是無法以生理生化的方法檢測出來，而以去氧核醣核酸序列分析法進行就能檢出。目前所知，抗性者基因除了發生沉寂片段(silent site) 替換之外，也發現抗性者其相應的突變是：易於起反應的 Tyrosine，取代了原來不易於起反應的Phenylalanine。以同樣果蠅基因序列分析法去進行其他昆蟲乙醯膽鹼酯解酵素分析，可得到相同結果，故確知結構基因定點突變(point mutation) 是昆蟲或蟎的乙醯膽鹼酯解酵素對有機磷殺蟲劑不敏感之所繫[52]。

早年由昆蟲毒理學家們所研發出來監測害蟲抗藥性的生化測定法，至目前爲止雖已行之有年，然而早在1977年就有學者指出，電泳法及離子交換管柱層析法很難用來分離生化特性非常相近的酯解酵素同功異構酵素，所以，以生化法監測解毒酵素的活性，是否就能反映出害蟲的抗藥性，尚須存疑[12]。故開發更精確的檢定法勢在必行。

免疫生化及核酸探針之檢定

由於近期分子生物學及遺傳工程技術的研發，一日千里，昆蟲抗藥性機制的研究雖然步調緩

慢，卻也逐漸由單一而簡單的劑量--死亡率曲線的傳統分析法，沿著生理生化法，往分子生物學詮釋抗藥性的分析方法上邁進，且以昆蟲解酯酵素爲抗原，製造抗體，用以快速偵檢田間族群是否攜有抗性因子的免疫生化速檢法已進行開發[19,23]，如蚜蟲及一種熱帶家蚊之羰基酯解酵素 (carboxylesterase)。這兩種昆蟲的酯解酵素彼此的抗體並不與彼此之抗原交相作用 (cross-reaction)。這表示同爲酯解酵素其抗體辨認抗原的接受情形，會因昆蟲的種類而異[49]。同樣的情形亦發生在小菜蛾幼蟲轉基酵素的第三及第四異構酵素。由此二異構酵素爲抗原所產生的抗體，除了對自己之抗原有反應外，也會對夜盜蟲抗原產生反應，但不會與雙翅目之三種昆蟲之抗原產生反應[31]。單氧酵素的抗體亦然[40]。以聚合脢鏈反應(polymerase chain reaction; PCR) 法複製對特定環二烯產生抗性的GABA接受器的相同位基因(allele)的探針來偵測害蟲族群中特定的抗性品系[55]，是核酸探針實用之一例。吾人必須就特定的抗體去偵測特定的抗原及以特定的核酸探針去偵測特定的相同位基因，是未來必須以較精確的免疫生化法或核酸探針法作爲田間抗藥性因子偵測的必然趨勢。就目前所知，傳統的毒理研究結果必須藉著近代的分子生物學技術所得的結果來作更精準的確認。而可以預見的是，快速的檢測田間害蟲族群抗藥性發生的情形，則必須要使用較以往更精準的生物科技檢驗法。導引這些新觀念、技術、方法，進入害蟲抗藥性的管理策略中，是未來防治害蟲工作上必然要走的趨勢。

抗藥性的遺傳研究

抗藥性的遺傳研究依 Georghiou 及 Taylor 二氏所言，應包括六個項目[26,27]。就抗藥性之偵檢方法而論可以依序分爲：1.當地防治害蟲的用藥背景、2.抗性基因的數目、3.抗性基因的顯隱性、4.抗性基因的發生頻率、5.害蟲抗性基因的表現能力及不同抗性基因間的交互作用、6.族群中帶抗藥性基因者其生存及繁衍之適應能力的高低。前三項多在實驗室內完成，後三項則須以實驗室所得結果，引用到田間予以應證、評估。

六個項目中的第一項是建立抗藥性基本資料檔所預先要做的，而印證的方法則是進行特定區域內不同地區各族群之害蟲抗藥性的檢測(bioassay)。如世界衛生組織之對於家蠅、蚊等衛生害蟲對DDT、BHC、馬拉松等殺蟲劑之全球性抗藥性之檢測[11]、鄭氏所作的臺灣小菜蛾族群對五種不同性質的殺蟲劑之抗性檢測皆屬最直接之基本資料[16]。這些資料可助於了解抗性族群是否存在，也可作爲瞭解抗性基因間彼此是否有交互作用之參考。

第二項研究則有賴於各種分析方法，包括生物化學、電生理、免疫生化、分子生物技術等檢測方法的利用，或以特定分子結構的農藥或協力劑進行活體或試管試驗，以推測有幾個因子(或基因)或何種抗性機制(抗性基因)參與害蟲之抗藥性。雖然吾人已知昆蟲抗藥機制多緣於單一機制(基因)，但是昆蟲的抗性機制緣於多基因的例子卻確實存在[46]。理論上，緣於單一抗性基因者，可以單雌雄配對(single female-male pairing) 循 Tsukamoto 的方法作抗性遺傳的分析試驗而得到結果[59]。由所得結果找出差別性劑量(discriminating dose)，用以施之於田間的族群，來印證是否害蟲已經產生抗藥性。多於一個抗性基因者，也可以用Tsukamoto 的方法來做分析試驗。但是答案並不像由單一抗性基因者般，如此簡單、明確。故必須以計量遺傳模式統計法(quantitative genetic model)的試驗來證明之。但是，基於多基因之計量遺傳統計分析法，是限定於田間選汰壓力不大，而强抗、弱抗基因無法釐清之狀況，始能適用的前題下。加上目前所知，主要抗性基因

如酯解酵素，因爲涉及到更繁雜的單份、雙份或多份的相同的結構基因存在的問題，尙未能適當地作進一步的列入計量遺傳統計之考量中[49]，故即使以致死百分之九十之差別性劑量施之於田間族群，也會發生評估上的困難。即使施之於田間的族群，所得結果，僅能用爲參考，而不便定論。

第三項因子之研究則必須藉純化了且已知其抗性機制的抗性品系與感性品系，使之雜交，再與純化了的感性品系與雜交一代作反交。後代予以第一項之生物檢測及第二項之抗性機制分析以闡明抗性機制之顯隱性。也可將雜交一代者與抗性品系作反交後，作前述檢測及分析以闡明抗性基因之性聯遺傳。進行兩代以上的反交試驗或有助於了解抗性機制是單因子或多因子之事實。當然如果有諸隱性標記基因 (recessive marker gene) 爲界定昆蟲個體是否具抗性機制個體的例子則更能具說服力。反交試驗之結果本身也有助於瞭解含有抗性基因之個體在族群中是否是繁殖及生存較弱勢的個體。以小菜蛾而言,就發生社子抗性族群帶ST8b9b 者不如雜交者，而有部份抗性者其單雌雄交配後代，無法有效地繁殖 (Maa, unpublished data)。

由於涉及 Tsukamoto 分析方法的生化遺傳研究限於兩個內在因素限制--隱性標記基因及遺傳組成簡單(simple genetic component)，使得只有符合此二條件的果蠅(*Drosophila* spp.) 成爲最搶手的試驗昆蟲，更加以其幼蟲有巨大唾腺染色體之易辨，因之早期昆蟲殺蟲劑之抗性遺傳生化之研究非它莫屬。而雙翅目、同翅目昆蟲及蟎類也能因染色體數目少，被研究的多些。目前吾人所熟知的昆蟲抗性機制在分子生物學上的認知，皆因循此線索而得。除了隱性標記的使用外，目前也有人試著由電泳標記(electrophoretic marker)上，去找可用的遺傳標記。例如在一種夜盜蟲之可見標記[49]，又在小菜蛾身上的EST8b9b，可能涉及了單氧酵素及標的不敏感之乙醯膽鹼酯酵素二項因素參與的抗藥性機制(Maa, unpublished data)。

就一種熱帶家蚊而言，它對 DDT、合成除蟲菊精，類似擊倒因子的神經不敏感的抗性機制，在遺傳上均屬隱性。而它的抗有機磷、氨基甲酸鹽劑之改變型乙醯膽鹼酯解酵素、或抗環二烯的接受體改變者，兩抗性機制之遺傳表現部份爲全顯性。而大部份涉及代謝抗性之機制，皆屬顯性[49]。而鱗翅目、鞘翅目等多數農業害蟲，其染色體至少在二三十對以上[5]，以小菜蛾而言，其染色體在顯微鏡下且呈顆粒狀，且大小相差無幾[2]。因此，這些害蟲染色體之區分除了以近期發展出之脈衝電泳或能派上用場，目前還沒有更適宜的其它方法能予以有效分離，就抗性基因如何在染色體上定位 (mapping)問題如何解決就變得十分困難。是以，以單株抗體(monoclonal antibody)，及去氧核醣核酸探子－探子－聚合胺鏈反應(cDNA-probe-PCR)等生物技術(biotechniques)用以偵測及解析鱗翅目害蟲的抗性基因，似是未來必須走的路子。

第四項之研究主要是針對田間族群之抗性基因存在狀況的評估，必須在前三項資料已完全掌控的狀況下，方能順利地進行。實驗室之毒理實驗固然可找到上述三項研究所求之結果，找出適當的差別致死劑量，以之施用於田間。但是由實驗室所得，對感性或雜交個體之差別性致死劑量，在實驗室或可除去所有感性因子或抗性因子爲穩定之表現型之個體。但是，同樣的致死劑量，如果施用於田間，就不一定能達到相同的目的。主因在於田間蟲口生理時期發生並不像操作在實驗室般，那麼一致。更何況，有的實驗室對毒理、抗性研究爲取得結果的方便，犧牲了應用到田間防治的實用性，而忽略了兩種狀況的不同。如此，當然不會得到最理想的結果。而往往兩狀況下，所得結果差異性大的出乎意料[48]。是以抗性研究宜以田間耐性最强之生理時期之蟲口爲考量，否則實驗室所得結果並不適用於田間防蟲施藥之參考。針對這個問題，學者提出田間害蟲族群之

監測 (monitoring) 所用差別致死劑量，應以百分之九十致死率爲宜[45]。第四項之研究也應該試著循近代分子生物學的技術而行之，則易收監測之效。

英國人Sawicki及Devonshire二氏前後經歷了二十年的研究[19,20]，由田間找到抗藥性桃蚜、檢定其抗性機制以遺傳生化法決定七個品系抗性之强弱，更由蛋白質、而訊息核醣核酸(mRNA)、而去氧核醣核酸探子(cDNA)、到瞭解結構基因的重覆出現 (gene amplification) 所表現出來的强抗性、到去氧核醣核酸的甲基化 (methylation)，涉及了族群之抗性消失(reversion)。此一系列井然有序的長期研究的結果，是一個數十年來令殺蟲劑毒理學家們鼓舞的實例。同樣地，一種蚊子之抗性研究也曾由基因之抗性研究落實到田野[25,37,38]。這兩個實例也證明了抗性的研究不再是天馬行空的理論。而此一實例也證實，落實理論到實用必須重視生物化學、分子遺傳及生物技術的研究，方克有成。有心人士，不應該漠視它所代表的時代意義。

第五項之研究也必須要藉著隱性之"遺傳標記"行之。以抗大滅松(dimethoate) 的丹麥家蠅爲例，它的一個抗性品系竟涉及了六個抗性基因，與感性者比較其抗性高120倍。其中六個抗性基因中的兩個分擔抗性甚少，其抗性之呈現是在協力劑及其他殺蟲劑篩選之後，另一各在三號染色體及五號染色體者，分擔 1.5到3.8倍之抗性，其突顯是因爲曾經DDT及大淨農篩選過。剩下兩個基因都在二號染色體上，兩者分擔11到32倍抗性，其抗性突顯皆因大滅松頻頻施用所致。可以推測在實際實驗室內篩選結果多以多因子表現，在田間特定殺蟲劑之使用，會使被篩選者，即害蟲，因適應而演化出特定的抗性基因表現，且多以單因子爲主。是以實驗室內之資料，並不能硬生生的延伸到田間去使用[49]。某些狀況下，發生在田間的單因子抗性的表現，會因其他殺蟲劑之使用，而附加上其他抗性因子。如抗陶斯松 (chlorpyrifos) 的一種蚊子，先發生基因解毒之解酯酵素因子，而後又有變異之乙醯膽鹼酯解酵素及單氧酵素之參與，欲掌握此中單、雙、多因子之抗性基因之表現在田間族群抗性遺傳之研究，誠屬不易。

第六項爲有抗藥性基因者其生存及繁衍、適應能力之研究。一如第四及第五項，最好有"隱性遺傳標記"參與其中。其研究範圍不僅涉及抗性族群對生態環境之適應性之外，更涉及族群在變異、選汰、遺傳播遷 (gene drift)、基因流(gene flow) 交互作用下，所衍生的抗性基因頻率 (gene frequencies)之改變[7]。前三者是殺蟲劑未嘗使用前，最初決定相同位抗性基因(resistance alleles)的頻率因子，而選汰及基因流兩者則是隨殺蟲劑使用後，影響抗性演化最主要的二因子。由於這一項研究涉及生態因子及遺傳因子交錯之複雜性，更加上抗性因子多爲不完全顯性(semidominant in expression) 及相同位基因的多態、多倍性。相對地，使著手釐清田間害蟲族群中懷有抗性基因者之生存、繁衍、適應能力之研究，更不易闡明。

以下是 Roush 及 Daly 二氏就殺蟲劑抗藥性演化之防治管理策略中所提議的田間施藥時慮的事項[49]。

一、當殺蟲劑使用時，減低抗性個體的適應性

1. 增加劑量以去除異質結合子(heterozygotes)或抗性之同質結合子(homozygotes)。
2. 使用只會引起低度抗藥性發生之殺蟲劑。
3. 針對生理感藥性發生期施藥。
4. 使用協力劑以抑制解毒機制。
5. 混用不同作用機制之殺蟲劑。

二、減低篩選壓力

6. 減少殺蟲劑之使用濃度，使某些感性個體在施藥情行下得以存活下來。
7. 減少施藥次數。
8. 使用殘效性短、作用快的殺蟲劑。
9. 保留部份防治區不與施藥，使用點狀處理。
10. 輪流施用不同作用機制之殺蟲劑作隔離世代之施用，但須避免混雜處理。

結　論

防治田間或居家害蟲的殺蟲劑在50年代期間，是以殺蟲劑有效與否，既致死率的高低，來作爲施用指標[8]。60年代，人們注意到了殺蟲劑引起的殘毒、抗藥性及次級害蟲的問題[9]。70年代興起了生物化學上的昆蟲抗藥性機制的熱烈討論[29,57]，促使害蟲抗性生化遺傳研究的投注[22,41]，使得農藥、抗性、遺傳間呈現出互動的學門研究。80年代殺蟲劑防治害蟲著眼點，已由單純的殺蟲致死率指標的主軸上移出，而與昆蟲抗藥性遺傳發生之研究相結合[41,46]。90年代，更以快速的生化儀器的開發結合分子生物學及遺傳工程技術的進展，將以往害蟲抗藥性機制的疑點逐一破解，抗性認知上更由傳統的個體致死率轉進到遺傳基因的複製或突變之分子遺傳生物學之層面，進而思考到了抗性族群生態遺傳的綜合探討。然而誠如所言，幾十年來抗性研究層次固然逐年提昇，但是因爲無法結合族群遺傳研究，使之應用到田間，是以無法使昆蟲抗性結果在理論層面延伸到實用的抗性族群之控制，更無法有效抑制因農藥之選汰所導致的抗性族群演化的發生，而致使實驗室的研究結果乃局限在實驗室中的窘境[1]。

邁入人類的第二十一世紀前，生物科學及技術的研究，已因分子生物學、分子遺傳學、族群生態學、神經生物學等學科的蓬勃發展而令人在殺蟲劑致毒機制及害蟲抗藥性的田間應用認知上，與以往所認知者有截然不同的衝擊感受。三、四十年前，由致死率百分之五十掛帥的農藥毒理資料[4]早已不足以主導田間用藥防治害蟲的方向。對於如何統合相關學門的專家，進行對於害蟲抗藥性的瞭解、抗性族群發生之偵檢、抗性族群演化之預防等諸實際問題如何應用於害蟲管理策略之謀求解決，不能再踟躕不前了。先進國家如美國，則早在十年前就已注意到此問題的嚴重性，召開了會議，提出了建言[8]。國內農政單位一向注意作物害蟲的藥劑防治，國內專家學者對農藥抗性的研究在國際上也有一定的地位，農藥研究更有專責的研究機構，且經費充裕、人才濟濟。我們殷切企盼能看到農政單位相關的領導人、學者、專家，在短期內再聚一堂，就未來將發生的重要害蟲抗藥性的問題，共商防治管理的大計。

謝　辭

本文的完成，要感謝本研究室的助理劉靜芬小姐的協助。也多謝本所研究員王清澄博士及寇融博士在百忙中，抽空費心的校稿、訂正。對國科會(National Science Council)在敝人所作小菜蛾抗藥性的生化遺傳專題研究上予以長期經費的補助，要致最大的感謝。對省農試所應用動物系羅主任幹成的鼓勵及植保新科技研討會籌備會的諸位學者專家的推薦，在此也要致最誠摯的謝意。

參考文獻

1. 王清澄、林飛棧。1985。有關抗藥性研究的幾個看法。pp. 71-82.農藥毒性研討會論文專集。周延鑫、林飛棧、馬堪津、王清澄 編輯。中央研究院動物所專刊。中央研究院。
2. 李聖慧。1989。小菜蛾細胞株建立之研究。碩士論文。國立中興大學。
3. 周延鑫、林飛棧、馬堪津、王清澄。1985。農藥毒性研討會論文專集。中央研究院動物所專刊。中央研究院。
4. 洪維懷。1965。臺灣植物保護工作:昆蟲篇 pp. 5-10. 劉廷蔚先生六十歲紀念文集。中華彩色印刷公司。台北。
5. 牧野佐二郎。1948。動物染色體數綜覽。北隆館。東京
6. 張宗炳。1987。殺蟲藥劑的分子毒理學。農業出版社。北京。
7. 張慧羽。1985。昆蟲抗藥性的族群遺傳。pp. 83-92.農藥毒性研討會論文專集。周延鑫、林飛棧、馬堪津、王清澄 編輯。中央研究院動物所專刊。中央研究院。
8. Anonymous 1986. Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management. National Academy Press. Washington D.C.
9. Brown, A. W. A. 1951. Insect Control by Chemicals. John Wiley and Sons Inc. New York .
10. Brown, A. W. A. 1963. Insect resistance. Farm Chemicals 126(10):21-25; (11):24-28; 127(1):58-69.
11. Brown, A. W. A., and Pal, R. 1971. Insecticide resistance in Arthropods. WHO. Genera.
12. Brown, T. M., and Brogdon, W. G. 1987. Improve detection of insecticide resistance through conventional and molecular techniques. Ann. Rev. Entomol. 32:145-162.
13. Busvine, J. R. 1951. Mechanism of resistance to insecticide in house flies. Nature 168:193-195.
14. Carson, R. 1962. Silent Spring. Houghton-Mifflin, Lo.
15. Chamber, H. 1973. Thio-esters as substrate for insect carboxylesterases. Ann. Entomol. SOC. Am. 66: 663-65.
16. Chen, E. Y. 1981. Insectide resistance study in *Plutella xylostella* L.II a general survey (1980-81). J. Agric. Red. China 30:285-293
17. Clark, J. M., Scott, J. G., Campos, F., and Bloomquist, J. R. 1995. Resistance to avermectins: extent, mechanisms, and management implications. Ann. Rev. Entomol. 40:1-30.
18. Cohen, E. 1987. Chitin biochemistry: synthesis and inhibition. Ann. Rev. Entomol. 32:71-94.
19. Devonshire, A. L. 1989. Insecticide resistance in *Myzus persicae* : from field to gene and back again. Pestic. Sci. 26:375-382.
20. Denvonshire, A. L., and Sawicki, R. M. 1979. Insecticide-resistance *Myzus persicae* as an example of evolution by gene duplication. Nature (London) 280:140-1.
21. Farnham, A. W. 1977. Genetics of resistance of house flies (*Musca domestica* L.) to pyrethroids. I knockdown resistance. Pestic. Sci. 8:631-636.
22. Feyereisen, R., Koenes, J. F., Carino, F. A., and Daggett, A. S. 1990. Biochemistry and molecu-

lar biology of insect cytochrome 450. In H. H. Hagedorn, J. G. Hildebrand, M. G. Kidwell, and J. H. Law [eds.], Molecular Insect Science. Plenum Press. New York.

23. Field, L. M., Deveonshire, A. L., Ffrench-constant, R. H., and Ford, B. G. 1989. The combined use of immunoassay and a DNA diagnostic technique to indentify insecticide-resistant genotypes in the peach-potato aphid, *Myzus persicae.* Pestic. Biochem. Physiol. 37:174-178.
24. Finney, D. J. 1971. Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge Unversity Press, Cambridge.
25. Georghiou, G. P., and Pasteur, N. 1950. Organophosphate resistance and esterase pattern in a natural population of the southen house mosquito from California. J. Econo. Entomol. 73:489-492.
26. Georghiou, G. P., and Taylor, C. E. 1977. Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. J. Evon. Entomol. 70:319-323.
27. Georghiou, G. P., and Taylor, C. E. 1986. Factors influencing the evolution of resistance in pesticide resistance, pp. 157-169. Strategies and Tactics for Management. 1986. National Academy Press. Washington D.C.
28. Graham, F. Jr. 1970. Since Silent Spring. Greenwich, Fawett, Conn.
29. Hodgson, E. 1968. Enzymatic Oxidations of Toxicants. North Carolina State University, Raleish, N. C.
30. Kao, C. H., and Sun, C. N. 1991. In vitro degradation of some organophosphorus insecticides by susceptible and resistant Diamondback moth. Pest. Biochem. Physiol. 41:132-141.
31. Kao, L. R., Motoyama, N., and Dauterman, W. C. 1984. Studies on hydrolases in various house fly strains and there role in malathion resistance. Pestic. Biochem. Physiol. 22:86-92.
32. Konno, T., Hodgson, E., and Dauterman, W. C. 1989. Studies on methyl parathion resistance in *Heliothis virescens.* Pestic. Biochem. Physiol. 33:189-199.
33. Ku, C. C., Chiang, F. M., Hsin, C. Y., and Sun, C. N. 1994. Glutathione transferase isozymes involved in insecticide resistance of diamondback moth larvae. Pestic. Biochem. Physiol. 50: 191-197.
34. Matsumura, F. 1983. Penetration, binding and target insensitivity as causes of resistance to chlorinated hydrocarbon insecticides. pp. 367-386. In G. P. Georghiou and J. Saito [eds.], Pest resistance to pesticides. Plenum Press. New York.
35. Maa, C. J. W., and Lin, Y. M. 1985. Esterase of diamondback moth (*P. xylostella* L.) The antennal carboxylesterase of adult male with reference on male response to synthetic female sex pheromone. Bull. Inst. Zool. Academia Sinica. 24(2):165-176.
36. Mullin, C. A.,and Scott, J. G. 1992. Biomolecular basis of insecticide resistance: classification & comparison, pp. 1-23. In C. A. Mullin & J. G. Scott [eds.], Molecular Mechamisms of insecticide resistance diversity among insect. Ameri. Chem. Soc., New York.
37. Mouches, C., Pesteur, N., Berge, J. B., Hyrien, O., Raymond, M., Robert, B. de St. Vincent, Silvestri, M. de, and Georghiou, G. P. 1988. Amplification of an esterase gene is responsible for insecticide resistance in a california *Culex* mosquito. Science 233:778-780.

38. Mouches, C., Pesteur, N., Lemieux, L., Poplin, Y., Abadon, M., and Georghiou, G. P. 1988. Advances in molecular genetics of organophosphate-detoxifying esterase in insects, abstract, XVIII International Congress of Entomology, Vancouver, July 3-9, pp. 460.

39. O'Brien, R. D. 1966. Mode of action of insecticides. Ann. Rev. Entomol. 11: 369-402.

40. Ogita, Z., and Kasai, T. 1965. Genetic control of multiple esterase in *Musca domestica.* Jap. J. Genet. 40:1-14.

41. Oppenoorth, J., and K. van Asperen. 1960. Allelic genes in the housefly producing modified enzymes that cause organophosphate resistance. Science 132:298-299.

42. Peferoen, G. 1991. *Bacillus thuringiensis* in crop protection. Agro. Food Industry Hi-Tech 6:5-9.

43. Pickett, J. 1984. Prospects for new chemical approaches to insect control. Chemistry and Industry. pp. 657-660. Sept. 17, 1984.

44. Plapp, F. W. Jr., and Wang, T. C. 1983. Genetic origins of insecticide resistance, pp. 47-70. In G. P. Georghiou & T. Saito [eds.], Pest resistance to pesticide. Plenum Press, New York.

45. Plapp, F. W. Jr., Magaro, J. J., and Edelson, J. V. 1992. Diamondback moth in south Texas:a technique for resistance monitoring in the fild, pp. 443-454. DBM and Other Crifer Pest. AVRDC. Proceedings of the 2nd Internal. Workslop. Tainan, Taiwan.

46. Plapp, F. W. 1976. Biochemical genetics of insecticide resistance. Ann. Rev. Entomol. 21:179-197.

47. Ronis, M. J. J., Hodgson, E., and Dauterman, W. C. 1988. Characterization of multiple forms of cytochrome P-450 from an insecticide resistant strain of house fly (*Musca domestica*). Pestic. Biochem. Physiol. 32:74-90.

48. Roush, R. T., and Mckenzie, J. A. 1987. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. Ann. Rev. Entomol. 32:361-380.

49. Roush, R. T., and Daly, J. C. 1990. The role of population genetics in resistance research and management, pp. 97-154. In R. T. Roush & B. E. Tabashnik [eds.], Pesticide resistance in arthropods.Chaoman & Hall, New York.

50. Scott, J. G. 1990. Investigating mechanisms of insecticide resistance: method, strategies, and pitfalls, pp. 39-57. In R. T. Roush and B. E. Tabashnik [eds.], Pesticide Resistance in Arthropods. Chapman and Hall, New York.

51. Smith, R. F., Apple, J. L., Bottrell, D. G. 1976. The origins of integrated pest management concepts for agricultural crops, pp. 1-16. In J. L. Apple & R. F. Smith [eds.], Integrated Pest Management. Plenum, New York.

52. Soderlund, D. M., and Bloomquist, J. R. 1989. Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. Ann. Rev. Entomol. 34:77-96.

53. Soderlund, D. M., and Bloomquist, J. R. 1990. Molecular mechanisms of insecticide resistance. pp. 303. In R. T. Roush and B. E. Tabashnik [eds.], Pestcide Resistance in Arthropods. Chapman & Hall. Co. N. Y & London.

54. Staal, G. B. 1986. Antijuvenile hormone agents. Ann. Rev. Entomol. 31:391-340
55. Stechin, J. C., and Ffrench-constant, R. H. 1994. Amplification of specific cyclodiene insecticide resistance alleles by the polymerase chain reaction. Pestic. Biochem. Physiol. 48:1-7.
56. Tabashnik, B. E. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thringiensis* Ann. Rev. Entomol. 39: 47-80.
57. Terriere, L. C. 1979. The use of in vitro techniques to study the comparative metabolism of xenobiotics, pp. 285-320. In G. D. Paulson, D. S. Frear, and E. P. Marks [eds.], Xenobiotic metabolism: *In Vitro* Methods. Ameri. Chem. Soc. Washington D.C.
58. Tsukamoto, M. 1963. The log dosage-probit mortality curve in genetic researches of insect resistance to insecticides. Botyu-Kagaku 28(4):91-98.
59. Tsukamoto, M. 1983. Methods of genetic analysis of insecticide resistance, pp. 71-98. In G. P. Georghiou and T. Saito [eds], Pest Resistance to Pesticides. Plenum, New York.
60. William, C. M. 1967. Third generation of pesticide. Sci. Amer. 217:13-17.
61. Yu, S. J. 1996. Insect glutathione S-transferases. Zool. Studies, Academia Sinica 35: 9-19. Taipei, Taiwan, ROC.

A Brief Review on Insecticide Resistance and Perspective of Resistance Management of Insect Pest

Can-Jen William Maa
Institute of Zoology, Academia Sinica

Abstract

This article summarized the history of synthetic insecticides and the associated researches of insecticides including toxicology, biochemistry, and resistance mechanisms found in insect pests. Detection and monitor of insecticide resistance and resistance mechanisms were based on both genetic studies as well as different techniques. Major resistance mechanisms including point mutation, change of a gene or change of a regulatory gene were revealed through molecular biology techniques. Genetic studies on regulation of resistance genes in laboratory strains and in field populations were perspectively emphasized in respect of resistance management for effective control of insect pests.

Key words: insecticide, resistance, diagnosis, genetics, management.

「植物保護新科技研討會」專刊
臺灣省農業試驗所特刊第57號 pp. 87-94 (1996)

農藥殘毒快速檢驗技術之研發

鄭允、高靜華、邱紀松、周桃美、李月嫦、曾佳琳
臺灣省農業試驗所應用動物系

摘要：爲因應快速運銷鮮食蔬果之農藥殘毒檢驗問題，台灣省農業試驗所補充現行精密但耗時之化學檢驗技術，改依毒理學基礎，製備對農藥敏感之酵素或微生物，開發快速檢測農藥殘毒技術。該體系結合生物性探針酵素反應、光譜分析及化學薄層分析等方法，研製成功「蔬果農藥殘毒快速檢驗」技術，可檢驗(1)具神經毒性之殺蟲劑-有機磷及氨基甲酸鹽劑及(2)有機硫磺劑及其他數類殺菌劑。分析的層次已可由毒性之檢測，以至快速追蹤定性及定量。

快速檢驗之研發始於民國70年，係利用純化自敏感品系家蠅腦部之乙醯膽鹼酯酶(acetylcholinesterase, AChE)，經 Ellman's test 檢驗蔬果樣品中是否含有劇毒殺蟲劑之殘毒，目前可檢出前述兩大類具神經毒性藥劑 (含個別藥劑達75項以上)，檢出感度可分兩段，爲 0.1-0.8ppm 及0.8-4ppm，分別具有不同之應用性。民國78年創新完成以蘇力菌檢出殺菌劑殘毒之快速技術，除檢出有機硫磺劑外，亦適用於抗生素、銅劑等超過15種之他類殺菌劑，檢出感度爲1-2ppm。以上兩項殺蟲劑及殺菌劑之檢驗技術經整合後，可在4小時內完成50件蔬果樣品之殘毒篩檢。

民國80年結合酵素反應及薄層分析法完成殺蟲劑殘毒之定性定量分析，目前已建立個別藥劑在不同溶劑展開系統之Rf值資料，可供查詢比對使用。83年則再開發快速檢出 organothiophosphates 類藥劑之技術，係於樣品萃取時添加溴水，而將有機磷之P→S轉換爲P→O，大幅提高檢出敏感度，目前僅有phosphoramidates 藥劑尚因對 AChE 不敏感而無法快速檢出。

「蔬果農藥殘毒快速檢驗」技術經多年之推展，多處農會、合作社場、果菜市場及政府機關均已採用，目前全省已設置之檢驗工作站有60餘處，農試所除提供檢驗試劑外，並定期辦理檢驗人員培訓及新技術之研習。快速檢驗之國際合作方面，除新加坡及泰國之農業部已於民國80年及84年分別派員至本所研習外，農試所並接受「亞太糧食肥料技術中心」之委託，針對亞太地區七個國家之學員，於82年辦理國際「農藥殘毒快速檢驗技術」研習會，84年起並至海外進行巡迴講習，84年已於菲律賓辦理，85- 87年則將繼續於馬來西亞、越南及泰國辦理技術研習，訓練各國之工作人員。此項新技術因具高度之應用性，已在亞熱帶地區蔬果種類及病蟲害繁多之國家，成爲與傳統之農藥殘毒化學分析方法平行互補之新興技術。

關鍵詞：農藥殘毒、快速檢驗、殺蟲劑、殺菌劑、乙醯膽鹼酯酶、蘇力菌、薄層分析、定性定量分析。

前　言

本所百週年慶辦理之系列學術研討，植物保護部份以新科技之發展爲辦理主題，因爲「農藥殘毒快速檢驗」爲光復以來，本所獨有之研發特色，而成爲一報導單元。民國48年梁同庭先生以

務實的態度建立農藥殘毒之生物檢驗技術及體系，而在國際上首創以「殘毒預警制度」維護蔬菜安全品質[3]，此後農藥研究室一脈承襲此一立場繼續研發，將純生物性之檢驗進一步發展爲結合生化及化學基礎之「蔬果農藥殘毒快速檢驗」技術，或稱「快速檢驗」，不僅成爲本省農業推廣之基本科技，亦引起國際之重視，而成爲對外新科技交流之重要項目，在此次研討會中將詳就研發過程，以及國際交流之成效等方面加以介紹。

「快速檢驗」之社會需求

歐美國家殘毒管制系統所採用之化學檢驗，並不適用於高溫多濕，病蟲害問題繁多，小農盛行之亞熱帶國家，其原因及解析已於民國81年「農藥安全研討會」之專文列述[10]。而新發展之「農藥殘毒快速檢驗」則因其高度之應用價值而廣受市場、農會，甚至衛生單位所採用。自民國74年西螺果菜市場首先設立第一處「蔬果農藥殘毒快速檢驗站」以來，迄今已增加至68站，遍佈全省及北高兩院轄市之各級農業、衛生單位，並獲消費者保護團體之認同[5,6,7,9]。民國84年行政院研考會之專題評估報告對此技術亦予以肯定，除要求全面實施外，並要求主管殘毒檢驗之衛生單位應循此一新發展方向，進行研究改進及立法[2]。

「快速檢驗」與傳統檢驗之認知差異

主掌農藥殘毒檢驗之機構，傳統上均以化學檢驗爲主體，强調精密正確爲唯一認知條件，而罔顧其檢驗結果是否具有應用價值之時效性。「快速檢驗」極具時效性之特點，因彰顯了傳統化學檢驗僅有「驗屍」之功能，而常促使消費大眾及媒體等要求政府革新現行之技術及法令。因爲「快速檢驗」之預警及把關兩項積極性功能受到肯定，難免地使主張傳統化學檢驗之人士感到困窘，或有情緒性之反彈，而引發兩學派之論戰。論戰對革新而言，有絕對的助益，因爲論戰可以赤裸裸地暴露出，持不同論點之檢驗體系及人員，在學識及對社會需求認知上之差異。然而，新技術之發展本來就是針對舊技術之缺失而進行改進與更新，是一種挑戰與革新。因此「快速檢驗」新技術的發展，無疑是對現行之檢驗及行政管理體系，進行了一次徹底的能力體檢。實例之一即爲，位居中央部會主掌殘毒檢驗之衛生署藥物食品檢驗局，在論戰的報告中暴露了它對有機硫磺類(Dithiocarbamates)殺菌劑與氨基甲酸鹽(Carbamates)殺蟲劑在毒理學上的作用，居然有分辨不清之嚴重問題[8,11]，以及台灣省農業藥物毒物試驗所對 Ellman's test 不瞭解之問題[1]。

「快速檢驗」之實施成效

自從實施「蔬果農藥殘毒快速檢驗」以來，台北農產運銷公司因爲採用此一新技術，已成爲全世界第一個能在市場拍賣前，成功地攔截含毒蔬果之範例，對殘毒之把關能力遠優於歐美等科技先進國，也是我國法定「農藥殘毒檢驗技術」所師承之國家，目前尚無法達成的目標。「快速檢驗」爲國民健康把關的具體成效，自然使傳統的殘毒檢驗相形失色而受到社會大眾之注意。而此一由省農試所獨力開發出之「快速檢驗」技術，更引起了國際之重視，亞太糧食肥料技術中心爲此技術而開辦國際訓練班[14,15]，邀請亞洲地區七國學員參加，並獲菲律賓、泰國、馬來西亞及韓國等國家之重視而安排各項訓練，成爲我國發展之技術優於歐美國家之成功實例。

「快速檢驗」之理論基礎

快速檢驗純係以毒理學及生理學爲技術研發之藍本，並輔以化學分析方法，本質上屬綜合性之檢驗，不但以生物化學之探針補化學之不足，並以化學方法佐助生化分析技術，而兼具經濟及簡速之發展條件。其中，劇毒殺蟲劑之檢驗以乙醯膽鹼酯酶(Acetylcholinesterase, 簡稱AChE)進行分析，數類主要殺菌劑之殘留則以蘇力菌(*Bacillus thuringiensis,* B.t.) 進行生物檢驗。

「快速檢驗」之內容及目標農藥

1. 以AChE 偵測有機磷劑及氨基甲酸鹽劑之殘留。
2. 硫代有機磷之不敏感性可經由萃取過程中，添加溴水轉化爲正磷酸根後，再行檢測。
3. 凡 AChE 檢測呈陽性之樣品，均可進行薄層分析(TLC)檢出毒性物質之Rf值，再與資料庫中之Rf值比對，而鑑定其毒性來源。
4. 以蘇力菌檢測有機硫磺劑及雜環類等多類殺菌劑之殘留。

檢驗內容

殺蟲劑殘毒檢測

(A) AChE 檢測

1. 檢測目標：有機磷劑及氨基甲酸鹽劑。
2. AChE 來源：感性家蠅(*Musca domestica* L.) 經人工大量飼養後，收集其頭部大量製備 AChE，經冷凍乾燥後供試。
3. 蔬果樣品之萃取：切取表面積 18-24 平方公分之蔬果 (或重量相當於 1 公克植物組織)，加 1ml 甲醇混合振盪 3 分鐘後，傾出萃取液供試。此外，爲提高 AChE 對 thiophosphates 類之感度，利用添加溴水之方法已經測試成功。其檢驗內容如(5)，但在樣品萃取時另加 0.1ml 的 1% 溴水共同振盪，頃出萃取液後供試，即可測得 organothiophosphates 之毒性(表一)。

表一、含硫代有機磷殘毒之蔬菜樣品添加溴水後，提高檢出能力之範例

Table 1. Enhancing the detection of organothiophosphates by reacting with bromine water

殺蟲劑	葉片含藥濃度 PPM	AChE 抑制率, % (以1ml甲醇萃取)	AChE 抑制率, % (以 1ml甲醇及 0.1ml溴水萃取)
一品松	1.0	0	40.86
三落松	1.0	0	100
愛殺松	1.0	0	40.63
大利松	1.0	0	82.80
巴拉松	1.0	0	39.58

4. 檢測方法：以 Ellman (1959) 之 AChE 檢測方法爲基準，於分光比色儀下進行 AChE 之 kinetic mode 測試 3-5 分鐘，檢測其反應速率。
5. 測試狀況：玻璃比色管內加 3ml 緩衝液 (0.1 M PBS buffer，pH=8.0)、20 μl AChE 酵素稀釋液、20 μl 樣品萃取液，反應 3 分鐘後加入 20 μl 反應基質(0.075M ATCI，Acetylthiocholine iodide) 及 100 μl 呈色劑 [0.05M DTNB，5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)]，於 412nm 波長下讀取其呈色吸光度(absorbance) 增加速率。
6. 抑制率之計算公式：

$$\text{抑制率 (\%)} = \frac{\text{對照組吸光值} - \text{樣品組吸光值}}{\text{對照組吸光值}} \times 100\ \%$$

根據上述之檢驗步驟，可於十分鐘之內完成一件殺蟲劑殘毒之檢測。

(B) AChE 檢測之定性與定量

凡受檢蔬果樣品對 AChE 產生抑制作用時，即顯示有上述有機磷或氨基甲酸鹽兩大類劇毒農藥之殘毒存在。可將 10 μl 樣品萃取液滴於TLC矽膠板上，於三種不同溶劑系統下展開層析，再以 AChE生化反應之呈色技術標定樣品之Rf 值。經與各種農藥已知之 Rf 值比對後，即可判定其毒性係來自何種農藥。最後，再依所判定之農藥與 AChE 抑制率之檢量關係估測殘留量，而依序完成「殺蟲劑快速檢驗」之(1)篩檢、(2)定性與(3)定量等一系列工作目標。

有機硫磺劑及其他雜環類殺菌劑之快速檢驗技術

依高[4]測試出殺菌劑對蘇力菌生長可產生抑制作用之理論基礎，而逐步研發成功殺菌劑快速檢測技術[12]，其主要工作內容概述如下。

1. 檢測目標：有機硫磺劑及其他類別殺菌劑。
2. 蘇力菌來源：由 CCRC 取得之 *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*。
3. 蔬果樣品之萃取：切取表面積 18-24 平方公分之蔬果表皮 (或重量相當於 1 公克植物組織)，加 1ml EDTA 萃取液混合振盪 3 分鐘後，傾出萃取液供試。
4. 振盪培養及結果呈色：將樣品萃取液倒入含 1ml 蘇力菌培養液之三角瓶內，置入37℃恒溫振盪水槽內培養，90 分鐘後加入代謝指示劑 TTC (triphenyl tetrazolium chloride)繼續振盪 30 分鐘，最後再加入「反應中止」液，停止反應。
5. 檢測方法：樣品萃取液經步驟 (4) 之處理後，結果呈色極易分辨，因此可以用目測判定其呈色情形，必要時才需經離心，取上清液倒入比色管，以分光比色儀在 484nm 下進行吸光值測試，並比較與對照組吸光值之差異。
6. 抑制率之計算公式：

$$\text{抑制率 (\%)} = \frac{\text{對照組吸光值} - \text{樣品組吸光值}}{\text{對照組吸光值}} \times 100\ \%$$

7. 蘇力菌受對33種蔬菜上常用七類殺菌劑之生長抑制情形見表二。
8. 含高有機酸之水果樣品，需以修正之技術進行檢驗[12]。
9. 含抗細菌生長物質之植物不適用此一技術[12]。

表二、不同類殺菌劑抑制蘇力菌生長能力之比較*

Table 2. Average B.t. growth inhibition by various fungicides in the cyliner and plate assay

殺菌劑類別	測試殺菌劑種類	蘇力菌生長受抑制之百分率, %
抗生素	2	73.5
有機銅劑	6	45.2
有機硫磺劑	7	90.6
有機錫劑	1	82.0
有機氮劑	10	38.6
有機氯劑	3	65.0
其他	4	40.0

* 採用Cylinder and plate 法

「快速檢驗」之國際合作推展現況

自1985年推出快速檢驗以來，國外已有多處試驗研究單位洽詢檢驗技術、應用性及試劑供應等相關資訊(表三)，此外曾應新加坡及泰國農業部之託，於民國80年及84年分別辦理研習(表四)。而在國際合作方面，農試所接受「亞太糧食肥料技術中心」之委託，辦理國際「農藥殘毒快速檢驗技術」研習會，首先於1993年訓練亞太地區七國18名學員，第二階段則由該中心將研習列爲公元1995-2000年之五年巡迴講習重點工作，1995年已於菲律賓辦理，1996-1998年則將於馬來西亞、越南及泰國，分年繼續辦理技術研習，訓練各國之工作人員。

表三、1990-1995年函洽技術資料及要求提供檢驗試劑情形

Table 3. Requisitions for RBPR technical information and testing reagents

國別	姓名	洽詢時間
Argentina	Dr. C. A. Andrada	1994年10月
India	Dr. J. Thomas	1994年 6月
Guam	Dr. Mr. Mari Maruttani	1991年 3月
Korea	Mr. Soo-Gon Han	1993年 7月
Malaysia	Dr. T. M. Abdul	1993年 4月
	Mr. Cheah Uan Boh	1994年 3月
	Mr. Chai Lian Kuet	1994年 9月
	Mr. Tan Soo Hian	1995年 7月
Philippines	Dr. E. A. Verzola	1991年 5月
	Mrs. Paz B. Austria	1993年 6月
	Dr. A. W. Tejada	1993年 6月
	Dr. C. P. Padua	1994年 8月
	Dr. L. M. Varca	1995年 6月
	Ms. A. O. Marino	1995年 3月
Singapore	Dr. R. Ho	1990年 8月
	Ms. J. Lui	1993年 7月
South Africa	Mr. C. J. van der Berg	1990年 6月
Thailand	Mr. Kiattisak Jelatiranat	1993年12月
	Dr. B. Sikkamondhoj	1995年 3月
	Mr. M. G. Wright	1992年 8月
Western Somao	Mr. W. J. Cable	1993年 8月

表四、國外自行接洽農試所之訓練

Table 4. RBPR training for other countries

實施日期	學員國別	訓練地點
1. 1991年 1月20日至1月28日	新加坡農業部(2人)	台灣
2. 1995年 5月21日至5月27日	泰國農業部(18人)	台灣
3. 1996年：韓國(接洽中)	韓國(3人)	台灣

表五、亞太糧食肥料技術中心贊助之訓練

Table 5. RBPR training courses sponsored by the Food and Fertilizer Technology Center for the Asian and Pacific region (FFTC)

實施日期	學員國別	訓練地點
1. 1993年 4月21日至5月2日	7國18人	台灣
2. 1995年 2月27日至3月4日	菲律賓(53人)	菲律賓
3. 1996(預定)	馬來西亞	馬來西亞
4. 1997(預定)	越南、韓國	越南、韓國
5. 1998(預定)	泰國	泰國

參考文獻

1. 中國時報。 1987。「農藥殘留測試，汰菁存蕪」。中國時報 民國76年7月14日地方版 中興新村訊。
2. 行政院研考會。 1995。「食品安全衛生及管理改善建議(草案)」討論會建議案。(84年7月27日於研考會召開)。
3. 梁同庭。 1966。怎樣檢定蔬菜上的農藥殘毒。豐年 16:10-11。
4. 高靜華。 1989。蘇力菌之增殖及其對小菜蛾之殺蟲力受殺菌劑之影響。國立中興大學昆蟲學研究所碩士論文 53pp。
5. 歐陽莉。 1989。誰爲消費者把關-農藥政策被毒死了嗎? 消費者報導 93: 34-37。
6. 綠生活雜誌。 1994。反制農藥殘毒 p.176-182。
7. 蔡弘聰。 1994。蔬果農藥殘留問題。衛生報導 4(11): 2-8。
8. 臺灣省農業試驗所 。 1987。 七六農試應字第 7846 號函 (76年12月3日) －覆農委會76農糧字第6112638A號函 (76年11月27)查詢衛生署藥檢局1987年調查報告質疑「生化法」適用性之公函。
9. 鄭 允。 1989。蔬菜農藥殘毒問題之解剖與建言。消費者報導 93: 38-41。
10. 鄭 允、高靜華。 1992。蔬果農藥殘毒之快速檢驗。農藥安全研討會論文集 pp. 231-241。中國農業化學學會，台北。
11. 藥物食品檢驗局。 1987。利用生化檢驗法及氣相層析法進行蔬菜農藥殘留量之調查 18pp。行

政院衛生署藥檢局，台北市。
12. Chiu, C.S., C.H. Kao and E.Y. Cheng. 1991. Rapid bioassay of pesticide residues (RBPR) on fruits and vegetables. J. Agric. Res. China 40:188-203.
13. Ellman G.L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys. 82: 70-77.
14. FFTC. 1994. Testing for pesticides in food. FFTC Newsletter 103:2-3.
15. FFTC. 1995. Training course on rapid bioassay. FFTC Newsletter 108: 6-8.

Research and Implementation of Rapid Bioassay for Pesticide Residues (RBPR) on Fruits and Vegetables

E.Y. Cheng, C.H. Kao, C.S. Chiu, T.M. Chou, Y.C. Lee and T.L. Tseng
Department of Applied Zoology, Taiwan Agricultural Research Institute

Abstract

Chemical analysis for pesticide residues did not fit the diagnosing need in acute poisoning or monitoring the safety of fruit and vegetable in the fast-trading market. A toxicological method for the rapid screening and analyzing of pesticide residues has been developed by the combination of enzyme assay, microbial assay and TLC technique.

Residues of organophosphorus and carbamate insecticides were detected by Ellman's reaction with the acetylcholinesterase (AChE) and then determined by TLC for its identity, while the residue quantity was determined by the regression between pesticide concentration and % inhibition of AChE. Fungicide residue was assayed by *Bacillus thuringiensis* (B.t.) and then developed by TTC color reaction. One gram of plant sample was extracted with 1 ml methanol for insecticide test, or extracted with 2 ml of EDTA-DMSO solution for fungicide test. 20 ul of methanol extract was used for AChE assay, while 5-10 ul extract is enough for the qualitative TLC analysis. The thiophosphates were converted to their corresponding oxon-analogues by bromine water treatment in plant extract to increase the detectability by AChE.

Houseflies head AChE is more sensitive than the AChE from electric eel or honeybee. The 25% inhibition was considered as the threshold for detecting the residues of organophosphorus compounds and carbamats. Currently, the Rf values in three solvent systems of more than 30 organophosphorus and carbamate insecticides have been established for TLC identification.

The growth of B.t. is sensitive to the inhibition of ethylene bisdithiocarbamates (EBDC's) and other fungicides such as chlorothalonil, dinocap, captan and folpet. The sensitivities of B.t. test to

propineb, curzate-mancozeb, metalaxyl-mancozeb, mitram, mancozeb and maneb were above 0.7 ppm, and more than 12.5 ppm for zineb and Sankel. For chlorothalonil and dinocap, the sensitivity exceeded 2.5 ppm.

By combining the spectrophotometric AChE reaction, microbial assay of B.t. and TLC/biochemical AChE color development, two neurotoxic insecticide groups and the ETU-producing fungicides can rapidly be detected qualitatively and quantitatively. This pesticide residue diagnosis system can be used for both medical and agricultural purposes. More than 60 RBPR stations have been established in Taiwan, and the RBPR has also been adopted as the vegetable safety screening method for Taipei Public Health Bureau. Started from 1995, RBPR has been officially adopted in a 5-year's training program of the FFTC (Food and Fertilizer Technology Center for the Asian and Pacific Region), and training workshops has been and will be held in other Asian countries i.e., Philippines (1995), Thailand (1995), Malaysia (1996), Vietnam (1997) and Korea (1997), respectively.

Key words: pesticide residues, rapid bioassay, insecticide, fungicide, acetylcholinesterase, *Bacillus thuringiensis,* thin layer chromatography, qualitative and quantitative analysis.

「植物保護新科技研討會」專刊
臺灣省農業試驗所特刊第57號 pp. 95-108 (1996)

殺菌劑抗藥性發生之監測與預防

楊 秀 珠
臺灣省農業藥物毒物試驗所

摘要：殺菌劑抗藥性存在已久，倍使植物保護工作者困擾之問題之一，綜觀現今累計之研究，四大類藥劑可明顯誘導植物病原眞菌產生抗藥性，分別爲demethylation inhibitor(DMI)、benzimidazole、dicarboximide及phenylamide。抗藥性問題既已存在，其監測工作則爲刻不容緩之要務，其目的及重要性分別爲探討抗藥性產生之可能性、預測抗藥性問題之產生、測定抗藥性管理策略、探知抗藥性之進展、協助地區性使用殺菌劑之選擇、抗藥性之基礎研究；而於監測工作進行時，首要訂定抗藥性之基準點(baseline)，而後訂定測定方法，由於殺菌劑之作用機制不同，故抗藥性之監測方法亦隨之不同，常用者爲測定分生胞子發芽率、發芽管之伸長、吸器之產生及菌絲生長之抑制作用；至於絕對寄生菌則測定分生胞子之發芽、發芽管之伸長及接種後病斑擴展之抑制作用。抗藥性之預防爲抗藥性研究工作之另一重點，可執行之方向分爲開發新防治藥劑、藥劑輪流使用、藥劑混合使用、改變施用方式及施用時期、限制使用次數，而另一預防措施爲採用耕作防治策略，可行之方法爲栽種抗病品種、改變耕作方式、及進行病害預測等。

關鍵詞：殺菌劑抗藥性、監測、預防。

前 言

所謂殺菌劑抗藥性乃指殺菌劑經過一段長時間使用後，可誘導其防治對象產生穩定之變化，因而造成明顯之藥效降低之現象；隨著藥劑之專一性增加，導致抗藥性之產生更爲嚴重。而由於藥劑之長期刺激，促使敏感性菌株族群逐漸消退，抗藥性菌株得到更大之生存空間，亦使問題有增無減。國外有關植物病原眞菌之抗藥性研究雖無法與昆蟲抗藥性研究成果相提並論，但亦頗有進展，尤以灰黴病病原菌抗藥性之研究爲甚。臺灣有關植物病原眞菌之抗藥性研究起步較晚，成果亦無法與國外者相抗衡，但近年來已有逐漸被重視之趨勢。抗藥性之管理一般認爲包括五項，分別爲一、抗藥性之風險評估、二、訂定抗藥性監測之基準點、三、進行抗藥性監測、四、建立抗藥性預防策略及五、擬定抗藥性之管理策略，而將抗藥性之研究成果直接實際應用於田間，因受環境因子影響頗大，往往不易進行，而其重點被視爲田間監測與預防，故本文之重點乃著重於此。

植物病原眞菌抗藥性之發生

一般認爲殺菌劑之選汰壓力爲造成抗藥性之主要因素，而事實上影響抗藥性實際發生之關鍵因子共包括四項，分別爲一、抗藥性菌株之抗藥能力：若抗藥性菌株之抗藥能力衰退，可促進抗

藥性降低；二、可大量產胞而造成重複感染之病原菌較土壤傳播性病原菌易產生抗藥性；三、殺菌劑之選汰壓力；以及四、環境因子：包括適合病害發生之氣候、未曾接觸農藥之敏感性菌株引進之比率及數量等。植物病原眞菌之抗藥性發生最直接之因素與藥劑之開發使用有極密切之關係，亦即抗藥性之發生往往在新藥上市使用一段時間後陸續出現，因此若無新藥劑之開發銷售，則無新的抗藥性菌株出現，此現象可由圖一所列抗藥性之進展得到明確之証實[8]。同時由圖二亦可明顯發現，1982年以後殺菌劑之使用進展情形爲carboxamides, organotins, organophosphours, dicarboximides, phenylamides 以及dimethylation inhibitor，而植物病原眞菌之抗藥菌株亦隨著增加，幾可認定二者之增加成一正相關[9]。有關植物病原眞菌抗藥性之報告，最早出現於1962年，被報導者爲檸檬青黴病(*Penicillium digitatum*)抗 Biphenyl 之報告，以後陸續發現其他病原眞菌抗其他藥劑，綜合觀之，至目前已發現可導致植物病原眞菌產生抗藥性之藥劑有 Biphenyl, OPP, hexachlorobenzene, Organomercurials, dodine, benomyl, dimethirimol, kasugamycin, polyoxin, thiabendazole, oxycarboxin, fetin, edifenphos, metalaxyl, dicarboximides, triforine, triadimenol, fenarimol, 及imazalil，而已知會產生抗藥性之植物病原眞菌則有檸檬綠黴病(*Penicillium digitatum*)、小麥黑穗病(*Tilletia caries*)、燕麥白粉病(*Prenophora avenae*)、蘋果黑星病(*Venturia inaequalis*)、胡瓜白粉病(*Erysiphe cichoracearum*)、水稻稻熱病(*Pyricularia oryzae*)、梨黑斑病(*Alternaria kikuchiana*)、檸檬青黴病(*Penicillium italicum*)、菊花白銹病(*Puccinia horiana*)、甜菜葉斑病(*Cercospora beticola*)、胡瓜露菌病(*Pseudoperonospora cubensis*)、草莓灰黴病(*Botrytis cinerea*)、馬鈴薯疫病(*Phytophthora megasperma*)、胡瓜灰黴病(*Botrytis cinerea*)、仙克來灰黴病(*Botrytis cinerea*)、大麥白粉病(*Erysiphe graminis*)以及柑桔綠黴病(*Penicillium digitatum*)，詳見表一所列[8]。至於馬鈴薯塊莖於貯藏期之*Helminthosporium solani*感染亦被發現抗thiabendazole[14]。

臺灣有關植物病原眞菌抗藥性之研究起步較晚，因此研究報告亦較少，最早之報告出現於1981年之植物保護學會會刊，內容爲柑桔綠黴病(*Penicillium italicum*)對免賴得(Benomyl)之抗藥性研究，以後逐漸有菊花白銹病(*Puccinia horiana*)對嘉保信(oxycarboxin)、葡萄晚腐病(*Colleto trichum gloeosporioides*)對滅紋(Mon)、大富丹(Difolatan)、免賴得、撲克拉錳(Prochloraz)；炭疽病菌(*Glomerella cingulata*)對Benzimidazole；萵苣灰黴病(*Botrytis cinerea*)對Dicarboximide；灰黴病對甲基多保淨(Thiophanate-methyl)以及水稻紋枯病(*Rhizoctonia solani*)對有機砷(Arsenic acid)及維利黴素(validacin)等之抗藥性研究，詳見表二所列[1,2,3,4,5,6,7]。

抗藥性監測之目的及重要性

抗藥性之監測工作主要在於了解抗藥性發生之可能、田間實際發生情形、以及其擴展性，進而進行抗藥性之管理、訂定預防策略，以期有效降低其發生概率。因此依據Brent, K. J. 1988年之專文，殺菌劑之抗藥性監測主要之目的及重點在於下列幾項重點：一、探討抗藥性產生之可能性(investigate suspected cases of practical resistance)；二、預測抗藥性問題之產生(predict the appearance of resistance problems)；三、測定抗藥性管理策略(check resistance management strategies)；四、探知抗藥性之進展(track the progress of resistance with time)；五、協助地區性使用殺菌劑之選擇(guide fungicide selection at the local level)；六、抗藥性之基礎研究(advance basic understanding)[9]。

表一、植物病原眞菌抗藥性之報告

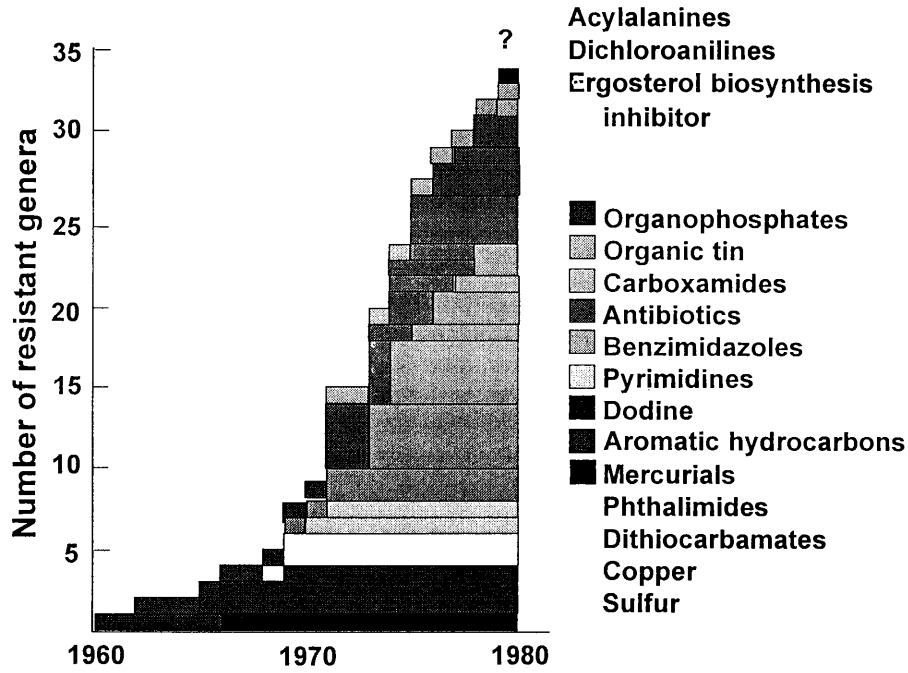
Table 1. Fungicide practical resistance reports

時間	藥劑	病原菌	作物	作者
1962	Biphenyl, OPP	*Penicillium digitatum*	檸檬	Harding
1965	Hexachlorobenzene	*Tilletia caries*	小麥	Kuiper
1966	Organo-mercurials	*Pyrenophora avenae*	燕麥	Nobel et al
1969	Dodine	*Venturia inaequalis*	蘋果	Szkolnik et al
1969	Benomyl	*Erysiphe cichoracearum*	胡瓜	Schroeder et al
1969	Dimethirimol	*Sphaerotheca fuliginea*	胡瓜	Bent et al
1971	Kasugamycin	*Pyricularia oryzae*	水稻	Miura et al
1971	Polyoxin	*Alternaria kikuchiana*	梨	Nishimura et al
1971	Thiabendazole	*Penicillium italicum*	檸檬	Harding
1973	Oxycarboxin	*Puccinia horiana*	菊花	Abiko et al
1976	Fentin	*Cercospora beticola*	甜菜	Giannopolitis
1977	Edifenphos	*Pyricularia oryzae*	水稻	Katagiri et al
1979	Metalaxyl	*Pseudoperonospora cubensis*	胡瓜	Reuveni et al
1979	Dicarboximides	*Botrytis cinerea*	草莓	Maraite
1980	Metalaxyl	*Phytophthora megasperma*	馬鈴薯	Davidse et al
1981	Dicarboximides	*Botrytis cinerea*	胡瓜	Katan
1981	Dicarboximides	*Botrytis cinerea*	仙克來	Pappas
1982	Triforine	*Sphaerotheca fuliginea*	胡瓜	Schepers
1984	Tridimenol	*Erysiphe graminis*	大麥	Butters et al
1985	Fenarimol	*Sphaerotheca fuliginea*	胡瓜	Schepers
1987	Imazalil	*Penicillium digitatum*	柑桔	Eckert

表二、臺灣殺菌劑抗藥性之研究狀況

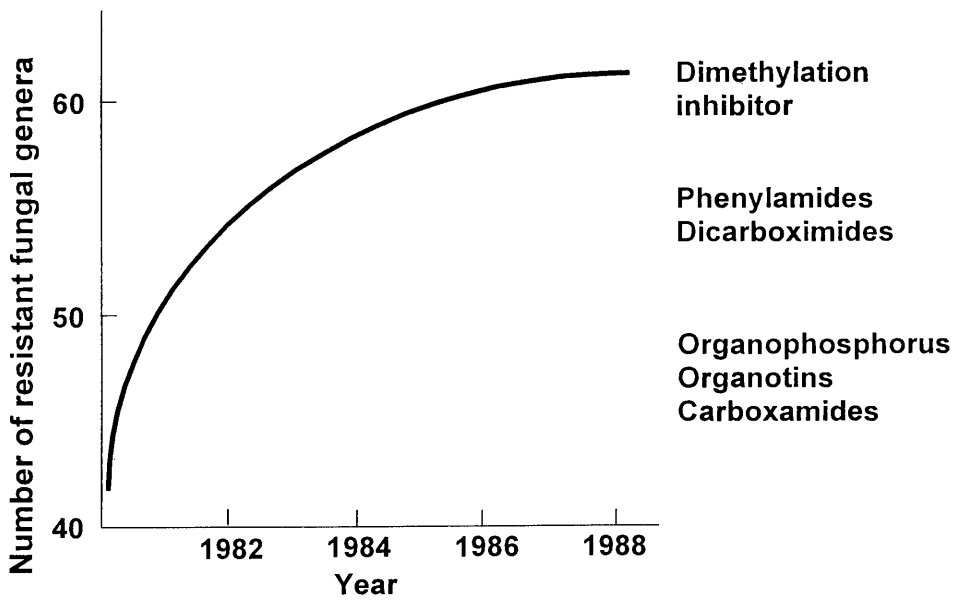
Table 2. Fungicide practical resistance in Taiwan

病害種類	藥劑種類
柑桔青黴病(*Penicillium italicum*)	Benzimidazole
菊花白銹病(*Puccinia horiana*)	Oxycarboxin
葡萄晚腐病(*Colletotrichum gloeosporioides*)	Mon, difolatan, benomyl, pyrochloraz
炭疽病(*Glomerella cingulata*)	Benzimidazole, thiophanate-methyl
萵苣灰黴病(*Botrytis cinerea*)	Dicarboximide
灰黴病(*Botrytis cinerea*)	Dicarboximide, thiophanate-methyl
水稻紋枯病(*Rhizoctonia solani*)	Arsenic acid, validacin



圖一、植物病原眞菌抗藥性之發展史[8]。

Fig. 1. History of resistance to disease control agents.



圖二、1982至1988年植物病原眞菌抗殺菌劑菌株之增加情行[9]。

Fig. 2. History of resistance to disease control agents during 1982 to 1988.

抗藥性監測基準點之訂定

在進行抗藥性監測工作前，需先訂定抗藥性監測之基準點(baseline)，以期有效而精確的監測抗藥性之實際發生狀況，其訂定之原則大約遵循下列二原則：一、藥劑於田間施用前建立，二、依不同藥劑種類訂定不同之基準，因此其基準點之訂定隨植物病原眞菌之種類及藥劑之不同而有差異，一般較常採用者有下列數種方式：

訂定濃度標準：灰黴病之抗藥性測定方法中，部份學者以培養基中10 μ g/ ml之濃度爲抗藥性之基準點，超過此濃度仍可生長之菌株則被認爲已產生抗藥性[19,20]。

MIC值訂定：梨黑星病抗藥性測定中，利用不同地點採得之菌株進行MIC值測定，而依此值之變化訂定其抗藥性之基準點，詳見圖三[15]。

菌落形態變化：以菌落形態評定抗藥性基準點時，一般將抗藥性菌落形態分爲3種：＋：產生單一小菌落，且不產胞，此類菌株爲弱抗藥性菌株；＋＋產生單一小菌落，菌絲生長少但可產胞，此類爲中抗藥性菌株；＋＋＋：菌絲生長及產胞均極良好，與敏感性菌株幾乎無差異，此類菌株爲强抗藥性菌株[19,20]。

測定EC_{50}之比率：測定灰黴病對dicarboximides之抗藥性時，測定敏感性菌株與抗藥性菌株之EC_{50}值之比率，一般此一比率達8-30時，可認定抗藥性問題已發生[19, 20]。測定蘋果抗DMI類藥劑時，亦利用敏感性菌株之ED_{50}值訂定，其基準點隨藥劑種類不同而異[17]。

Benzimidazole類殺菌劑之抗藥性監測之基準點訂定流程：1. 以敏感性菌株培養於含0 -10ppm殺菌劑之培養基平板；2. 測定藥劑對菌絲生長之抑制力；3. 計算MIC(minimum inhibition concentration)；4. 以MIC之2倍濃度爲測定抗藥性之基準點[12]。

抗藥性之監測

殺菌劑之作用機制與藥劑之種類及植物病原眞菌之種類有極密切之關係，但主要之作用機制可明確發現，一般殺菌劑對病原菌之作用點分別爲細胞壁(cell wall)、呼吸作用(respiration)、adenosine deaminase、microtubules、內質網(endoplasmic reticulum)、細胞膜(cytoplasmic membrane)、蛋白質合成(protein synthesis)、RNA合成酵素(RNA polymerase)、核酸合成(nucleic acid synthesis)[8,9]；藥劑之作用機制除有效抑制上述生化反應外，亦可增進；此類反應，因此抗藥性之監測方法依藥劑種類不同而有差異，茲按藥劑種類區分詳述其監測方法：

demethylation inhibitor(DMI) 類藥劑

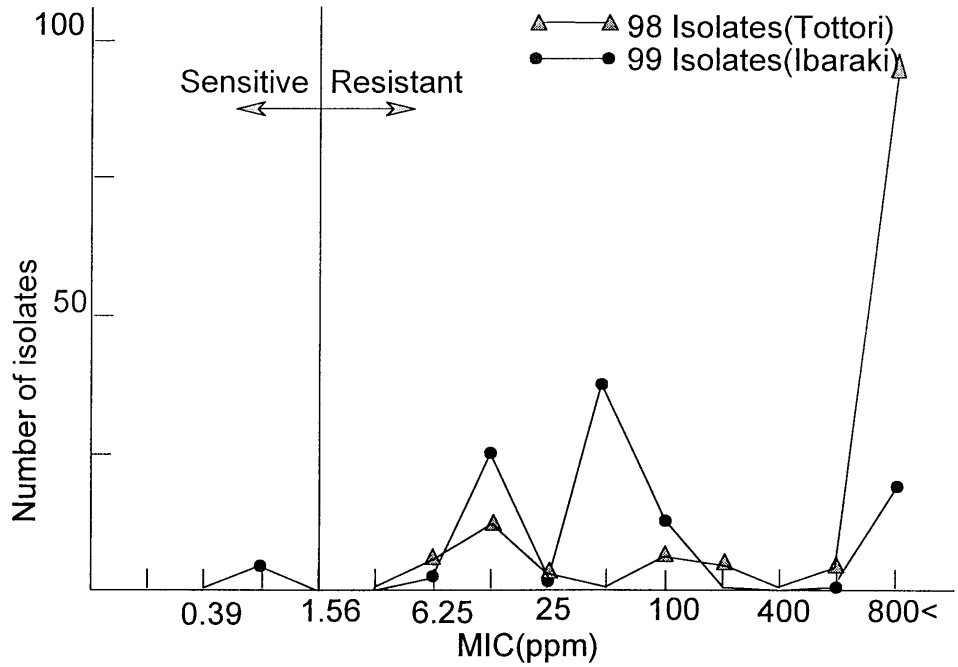
此類藥劑施用範圍相當廣泛，包括絕對寄生菌及非絕對寄生菌，其抗藥性監測方法亦因而不同，分別描述於下：

1. 絕對寄生菌：包括白粉病、銹病等：監測時首先於溫室培養寄主植株，待生長至可進行監測試驗時，於植株上噴施藥劑，再接種病原菌；待發病至適合調查時，逐一調查發病率，依據發病率計算ED_{50}及ED_{95}，並依下列公式算出敏感度。

   敏感度＝ED_{50} 標準菌株/ED_{50} 監測菌株×100%

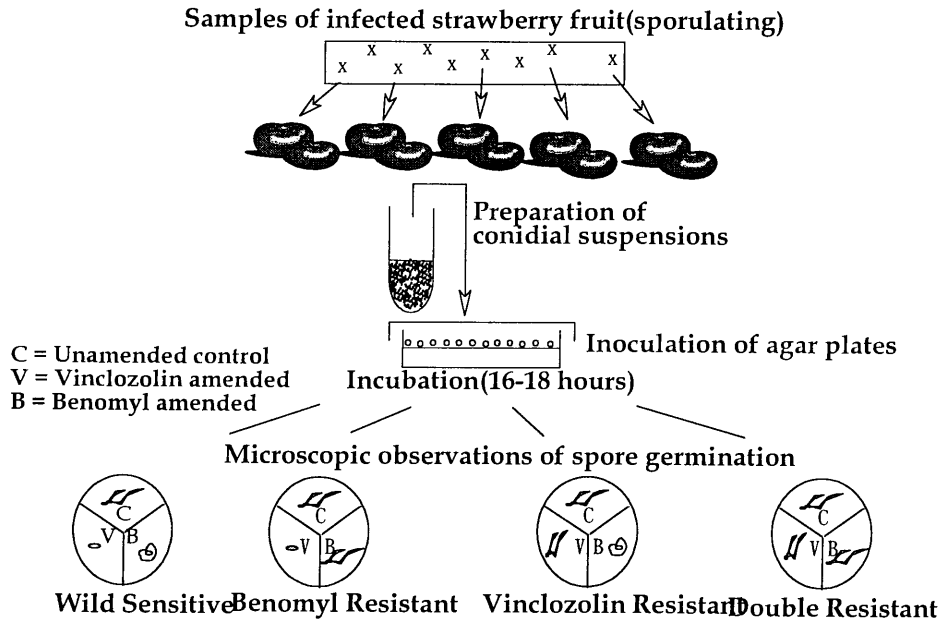
   sensitivity index =ED_{50} standard/ED_{50} test isolate×100%

2. 可培養之植物病原眞菌：可培養之植物病原眞菌之測定方法大致可採用下列三種方式：1. 施藥



圖三、梨黑星病對MBC之抗藥性基準點訂定。

Fig. 3. Build-up of baseline on MBC resistance occurred on *Venturia nashicula*.



圖四、灰黴病對殺菌劑抗藥性之監測方法及可能產生抗藥性之形式。

Fig. 4. Scheme of operations for monitoring fungicide resistance in *Botrytis cinerea* and possible resistance patterns (Source: Gullino and Garibaldi (1986)).

後接種，依據發病率計算敏感度；2. 測定藥劑對分生胞子發芽之抑制作用；3. 測定藥劑對菌絲生長之抑制作用[12]。

Benzimidazole 類藥劑

此類藥劑之監測方法有四：(一) 測定藥劑對胞子發芽之抑制力、(二)測定藥劑對發芽管伸長之抑制力、(三)測定藥劑對菌絲生長之抑制力及(四)測定藥劑對發病率抑制作用：此方法主要用於印證前述室內測定結果。依據上述測定方法，可定出benzimidazole 類殺菌劑之抗藥性監測流程如下：(一)建立敏感性(wild type)菌群之敏感基準點、(二)疑似抗藥性菌株之探討、(三)抗藥性擴展之預測、(四)訂定抗藥性管理策略[12]。

Dicarboximide 類藥劑：

此類藥劑通常測定藥劑對病原菌分生胞子發芽之抑制力，其測定流程詳如圖四所示。將罹病草莓果實採回實驗室，以殺菌水配製成分生胞子懸浮液後，培養於含藥劑之培養基上，16-18小時後放於顯微鏡下觀察，記錄發芽率及發芽管形態，並以不含藥劑者作爲對照。經採用電腦影像系統爲輔，進行本省灰黴病之抗藥性監測，民國80年至84年之調查結果詳見表三。表三結果顯示，藥劑間有交互抗藥性之現象，且抗藥性之發生並未有逐年增加之趨勢[9, 12]。

表三、灰黴病抗藥性之田間監測結果

Table 3. The monitoring of fungicide-resistance occurred on *Botrytis cinerea* in Taiwan

年份	不同藥劑之抗藥菌株數					總調查菌株數
	免得克寧	撲滅寧	依普同	免克寧	快得保淨	
80年	13	29	12	22		49
81年	23	43	45	68	26	125
82年	24	11	18	11	27	28
83年	27	52	50	48	0	110
84年	26	19	26	21	0	57

Phenylamide類藥劑：

此類藥劑之測定方式有三：

一、測定RF值：首先培養植株，再將藥劑噴施後接種病原菌，待發病情形具代表性時調查發病率，依據發病率計算EC_{50}及EC_{95}，並由此計算RF值。

$RF = EC_{\text{-value of field isolate}}/EC_{\text{-value if sensitive reference isolate}}$

二、測定藥劑對菌絲生長之抑制作用

三、測定同一族群中抗藥性菌株與敏感性菌株之比率(R/S)：其流程如下：

1. 發病初期利用單一劑量測定單一病斑對藥劑之感受性，每一樣品至少需採樣100病斑，計算同一採樣地區之R/S值、抗藥性比率。

2. 將病原菌稀釋至固定比率後，接種於不同劑量噴施之植株，並以未施藥者爲對照，計算R/S值[13]。

至於田間監測時之採樣方法亦隨寄主植物及病原菌而異，一簡易之設施可用於採集病原菌之分生胞子[18]。

抗藥性之預防

抗藥性研究之最終目的乃在於如何預防抗藥性產生，以減少因抗藥性產生之成本增加，常用之方法包括下列七項：

開發新防治藥劑：開發新藥劑以取代已產生抗藥性藥劑，可降低藥劑之選汰壓力，減少因抗藥性產生所造成之藥效降低。

藥劑混合使用：利用兩種或兩種以上不會產生交互抗藥性之藥劑混合使用，可降低藥劑之選汰壓力，而延緩抗藥性之產生，圖五及圖六可明確証實藥劑混合使用之效用[8,16]。而phynylamide類藥劑與其他藥劑混合使用可達抑制抗藥性產生之效果[21]。

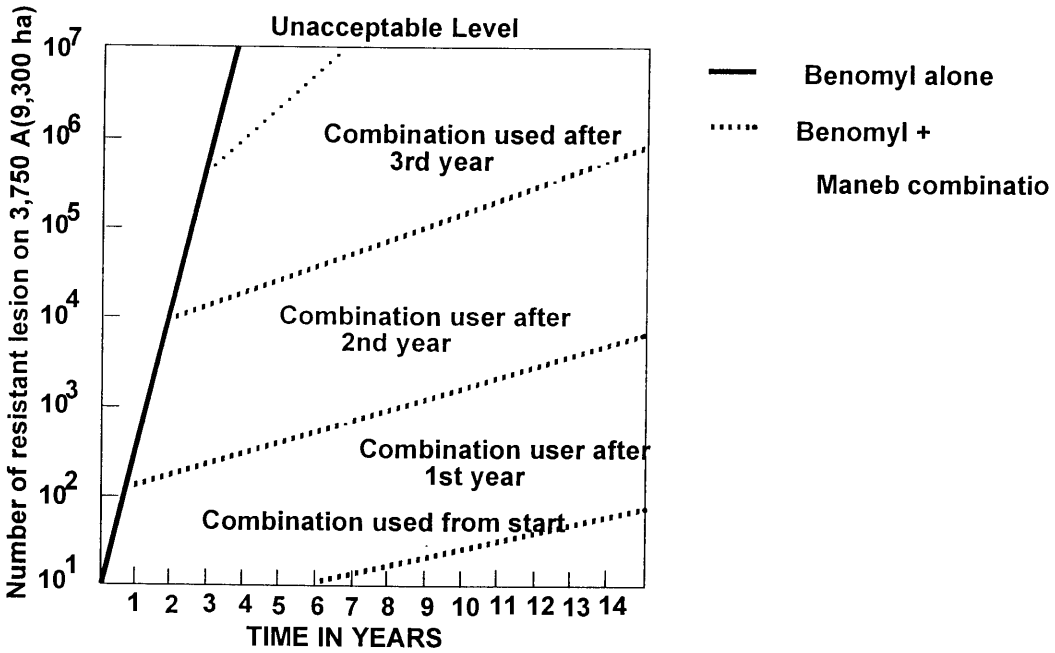
藥劑輪流使用：兩種或兩種以上無交互抗藥性之藥劑輪流使用時，導致抗藥性產生之機率會相對降低，合理而妥善之藥劑輪流使用或混合使用方法詳見圖七[16]。

藥劑混合及輪流使用策略配合應用：不論藥劑輪流使用或混合使用均可延緩抗藥性產生，若二者交替應用，則預防效果更佳，但應用此策略時，需特殊作用點之藥劑與非特殊作用點者、强效性與非强效者互相配合使用，其配合施用狀況可由圖八詳知[9]。

改變施用方式及施用時期、限制使用次數：有限制的使用農藥除可減少藥劑之浪費及環境污染，同時可因降低選汰壓力而避免抗藥性之發生。因此訂定藥劑施用策略時，應考慮下列五項原則：一、將選汰壓力降至最低；二、應多種施用方法互相配合應用，避免單獨施用；三、需於早期施用；四、宜選擇最適合之時宜、位置施用；五、訂定長程施用策略。至於Phenylamide類殺菌劑，因其藥劑特性及施用作用對象，合理而可行之施用策略應符合下列五因素：一、作爲預防用而非治療用；二、與其他不同作用機制之殺菌劑混合使用；三、以噴施爲宜，土壤處理時需採用不同劑型，種子處理時宜混合用藥；四、每年或每一生長期以施用2-4次爲限；五、早期施用或植物生長期施用[13]。

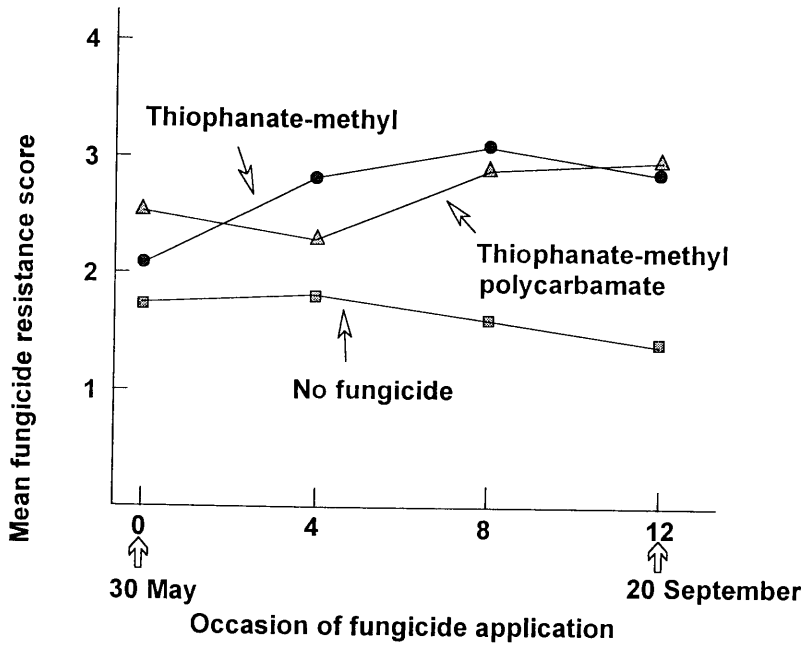
耕作防治策略：主要著重於栽培管理方式，可採用之方法極多，包括改變耕作方式(cultural practices)、栽種抗病品種(resistant cultivars)、進行病害預測(forecasting)、降低濕度及增加株距等。於栽培介質中添加吸水可降低麗格海棠灰黴病之發生，再配合藥劑施用並未降低發病率，詳見表四。至於定期灌注賀格蘭營養液，可促進植株之生長，增加其抵抗力，因此灰黴病之發病率亦相對降低，詳見表五。而利用生物防治、微生物製劑以取代化學藥劑亦不失爲預防抗藥性產生之良策[10, 11]。

定期進行抗藥性監測：隨時掌握最新資訊，可充分了解抗藥性於田間實際發生狀況，隨時掌握先機，進行上述之預防措施，以降低抗藥性之發生。



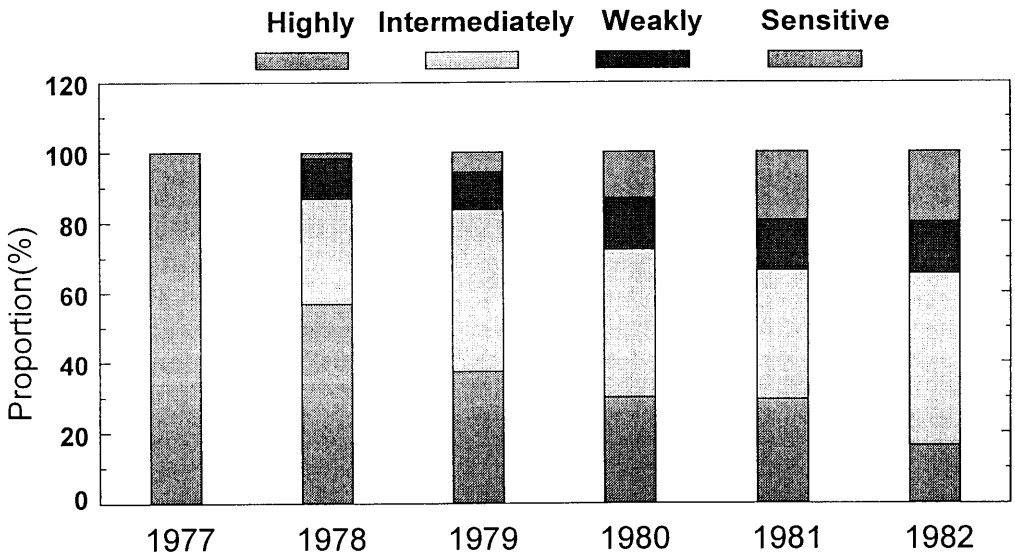
圖五、鋅錳乃浦與免賴得混合使用對芹菜葉班病抗免賴得之影響。

Fig. 5. Development of resistance to benomyl used alone or combined with maneb.



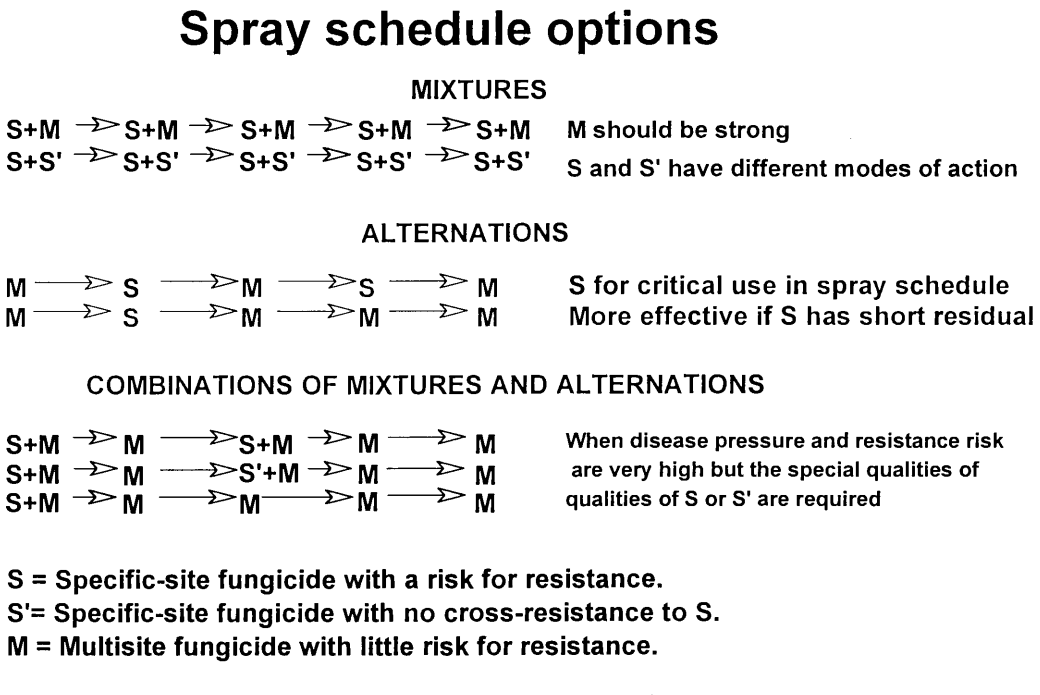
圖六、混合藥劑對梨黑星病抗藥性菌株建立之影響[16]。

Fig. 6. Build-up of mean fungicide resistance in population of *Venturia nashicola* (1981). Resistance scores: sensitive 1, weakly resistant 2, intermediately resistant 3, highly resistant 4.



圖七、藥劑輪流使用對梨黑星病病原菌抗藥性消長之影響[16]。

Fig. 7. Decline of fungicide resistance in *Venturia nashicola* in an orchard in which benzimidazole fungicides were replaced by other fungicides in 1977.



圖八、藥劑混合使用或輪流使用之施用模式。

Fig. 8. Fungicide spray schedule options.

表四、不同介質處理對麗格海棠灰黴病發病之影響

Table 4. The efficiency of fugicides combined with super sorb on the control of *Botrytis cinerea* occurred on begonia

處　　理	發病率(%)	
	11/19/94	1/18/95
吸水	2.56	0.87
吸水＋50% 依普同可濕性粉劑1500倍	8.41	0.64
吸水＋75% 快得保淨可濕性粉劑 500倍	4.69	0.88
吸水＋克氯得可濕性粉劑 2000倍	9.12	0.29
吸水＋50% Saphire WG 2000倍	7.91	0.19
吸水＋Kuf-6201 EC 1000倍	4.15	0.28
對照：無處理	5.45	2.03
	1.47	11.79

表五、控制養分對麗格海棠灰黴病發病之影響

Table 5. The efficiency of hoagland solution on the control of *Botrytis cinerea* occurred on begonia

處　　理	發病率(%)		
	11/ 9/94	12/21/94	1/ 4/95
賀格蘭營養液	3.1	0.93	5.09
賀格蘭營養液不加鈣鹽	7.8	1.87	1.80
對照：無處理	20.2	10.70	10.05

結　論

植物病原眞菌之抗藥性問題涵蓋相當廣泛，舉凡藥劑使用後之藥效消退情形均與抗藥性之發生習習相關，而抗藥性研究之最終目的在於預防抗藥性之發生，而每一研究方向均扮演互動關係，如何相互配合使用而達到預防抗藥性產生之目的，實爲極高之境界，非投以大量人力、物力配合長期研究無法達成。而目前科技日新月異，加以生物技術突飛猛進，如何配合應用，於植物栽培過程中增進其抗病性，以降低農藥使用量，則可相對降低抗藥性之發生。若能採用非農藥之防治方法，更可降低抗藥性於無形。

參考文獻

1. 王次男、J. R. Coley-Smith。1987。溫室萵苣灰黴病對Dicarboximide 類藥劑之抗藥性。植保會刊 29: 327-336。
2. 宇國勝。1981。柑桔青黴病之抗藥性研究。植保會刊 23: 193-199。
3. 孫守恭、裴家隆。1981。植物病原眞菌抗藥性菌系之調查研究(一)炭疽病菌(*Glomerella cingulata*)對Benomyl 之抗藥性研究。植保會刊 23: 207-220。
4. 斐家隆、孫守恭。1981。臺灣植物病原眞菌抗藥性菌系之調查與研究(二)菊花白銹病菌(*Puccinia horiana*) 對oxycarboxin 之抗藥性研究。植保會刊 23: 221-227。
5. 黃秀華。 1985。葡萄晚腐病菌不同抗藥菌系之生物學及生理上之比較。臺中區農業改良場研究彙報 11: 123-129。
6. 黃秀華。1985。葡萄晚腐病菌對Mon乳劑抗藥性菌系之調查研究。臺中區農業改良場研究彙報 11: 101-108。
7. 謝文瑞、段中漢。1984。葡萄晚腐病對滅紋、四氯丹、免賴得及撲克拉之抗藥性調查。植保會刊 26: 33-39。
8. Delp, C. J. 1980. Coping with resistance to plant disease control agents. Plant Disease 64: 652-657.
9. Delp, C. J. 1988. Fungicide resistance in North America. APS. 133PP.
10. Elad, Y. 1992. The use of antioxidants (free radical scavengers) to control grey mould (*Botrytis cinerea*) and white mould (*Sclerotinia sclerotiorum*) in various crops. Plant Pathology 41: 417-426.
11. Elad, Y., and Zimand, G. 1993. Use of *Trichoderma harzianum* in combination or alternation , with fungicides to control cucumber grey mould (*Botrytis cinerea*) under commercial greenhouse conditions. Plant Pathology 42: 324-332.
12. GIFAP asbl. 1991. FRAG methods for monitoring fungicide resistance. OEPP/EPPO Bull. 21: 291- 354.
13. Gisi, U. 1992. FRAG methods for monitoring fungicide resistance. OEPP/EPPO Bull. 22: 297-322.
14. Hide, G. A., and Hall, S. M. 1993. Development of resistance to thiabendazole in *Helminthosporium solani* (silver scurf) as a result of potato seed tuber treatment. Plant Pathology 42: 707-714.
15. Ishii, H., and Yanase, H. 1983. Resistance of *Venturia nashicola* to thiophanate-methyl and benomyl: formation of the perfect state in culture and its application to genetic analysis of the resistance. Ann. Phytopath. Soc. Japan 49: 153-159.
16. Ishii, H., Udagawa, H., Yanase, H., and Yamaguchi, A. 1985. Resistance of *Venturia nashicola* to thiophanate-methyl and benomyl: build-up and decline of resistance in the field. Plant Pathology 34: 363-368.
17. Koller, W., Parker, D. M., and Reynolds, K. L. 1991. Baseline sensitivities of *Venturia inaequalis* to sterol demythylation inhibitors. Plant Dis. 75: 726-728.

18. Lalancette, N., Jr.,Russo, J. M., and Hickey, K. D. 1984. A simple device for sampling spores to monitor fungicide-resistance in the field. Phytopathology 74: 1423-1425.

19. Lorenz, D. H., and Eichhorn, K. W. 1982. *Botrytis cinerea* and its resistance to dicarboximide fungicides. EPPO Bull. 12: 125-129.

20. Panayotakou, M., and Malathrakis, N. E. 1983. Resistance of *Botrytis cinerea* to dicarboximide fungicides in protected crops. Ann. appl. Biol. 102: 293-299.

21. Samoucha, Y., and Gisi, U. 1987. Use of two-and three-way mixtures to prevent buildup of resistance to phenylamide fungicides against *Phytophthora* and *Plasmopara*. Phytopathology 77: 1405-1409.

The Monitoring and Strategies to Control of the Fungicide Resistance

Hsiu-Chu Yang
Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute

Abstract

Fungicide-resistance is a old and big problem of plant protection in the field. The four group of fungicide was found to induce the fungicide-resistance is demethylation inhibition(DMI), benzimidazole, dicarboximide and phenylamide. The purpose and importance for fungicide-resistance monitoring are to investigate suspected cases of practical resistance, to predict the appearance of resistance problems, to check resistance management strategies, to track the progress of resistance with time, to guide fungicide selection at the local level, and to advance basic understanding. The baseline must be determined before fungicide-resistance monitoring. But the methods to determine the baseline are varied according to the fungicides and pathogen. The methods used popularly are the germination of spore, the elongation of germ-tube, the inhibition of the formation of haustoria and mycelial growth. Another importance work for fungicide-resistance is the control. New disease control agents, the use of mixtures, rotation of disease control agents, limitation of use, integrated control strategies was concerned the best ways to control fungicide-resistance problem.

Key words: fungicide-resistance, monitoring, control.

「植物保護新科技研討會」專刊
臺灣省農業試驗所特刊第57號 pp. 109-116 (1996)

果蔬檢疫殺蟲處理技術

張芳基、陳弘義、林志祥
經濟部商品檢驗局台中分局

摘要：各國爲保護國內農業生產之安全，對進口植物及農產品實施嚴格的植物檢疫，並以植物檢疫法禁止危險性病蟲害的國家、地區之鮮果蔬菜進口。而檢疫技術可將檢疫門檻打開，使農產品能在安全下順利輸入各國。合適的檢疫處理方法或處理系統須考慮檢疫害蟲、果蔬品質及處理方式等三大因素，首先應達到檢疫安全(quarantine security)，如各國間統計上的Probit 9以確保輸入國農業之安全性；維持果蔬品質，增強市場競爭實力爲開發果蔬檢疫處理技術的實質意義；處理方式除衡量前二項外，需評估其簡易性、無藥物殘留、商業運轉之可用性及消費者接受程度等原因，主要處理概括爲化學方法、物理方法及複合處理。臺灣外銷果蔬檢疫處理技術開發，乃主要針對歷年檢疫相當嚴格之日本，並說明開發情形、報告送審、來華認證、公告解禁及來華共同檢疫之程序。

關鍵詞：檢疫處理、水果、蔬菜。

前　言

各國爲保護國內農業生產之安全，對進口植物及農產品實施嚴格的植物檢疫，並以植物檢疫法禁止危險性病蟲害的國家、地區之鮮果蔬菜進口。開發植物檢疫處理技術主要是將檢疫門檻打開，簡單而言，即搭起疫區(infested areas)與非疫區(non-infested areas)間的溝通橋樑，使農產品能在安全下順利輸出各國。爲順應國際間農業貿易方面的急速成長，許多國家正積極研發新的檢疫處理技術來解決農產品的流通性。合適的檢疫處理方法或處理系統須考慮殺蟲效果、果蔬品質及處理方式等三大因素，首先一定須達到對方國家的檢疫安全(quarantine security)規定，以確保輸入國農業之安全性；另一方面要維持果蔬品質、增強市場競爭實力，其爲開發果蔬檢疫處理技術的實質意義；而處理方式除衡量前二項外，需評估其簡易性、無藥物殘留、商業運轉之可用性及消費者接受程度等原因，主要處理概括爲化學方法、物理方法及複合處理。

檢疫殺蟲處理考慮之三大因子

殺蟲效果

殺蟲效果之判定首先應確立對象害蟲，其次爲試驗室內生物性反應之先前試驗，而後進行感受性比較、小規模及大規模試驗。

1.確立對象害蟲

對象害蟲分類與生物學上之鑑定及了解，爲果蔬檢疫處理的第一步，如本省輸美荔枝與楊桃對東方果實蠅(*Bactrocera dorsalis* (Hendel))之冷藏檢疫殺蟲處理技術開發，依美方要求，首先需確定檢疫對象害蟲，其方式乃將試驗標本透過第三國－澳大利亞，果實蠅分類學家Dr. Drew 鑑定確立後，方審查該檢疫處理程序。

寄主與害蟲間之關係，對象害蟲之人工飼育及感染果蔬的方式(如人工接卵、自然產卵及網箱內强迫產卵等)，皆會直接或間接影響日後檢疫殺蟲處理的流程，如害蟲感染時期與果實成熟度的關係直接決定檢疫殺蟲處理之必需與否，當採收時果實熟度不能爲害蟲所感染寄生，便可不做任何處理，如臺灣青蕉外銷日本，就不需對東方果實蠅實行檢疫殺蟲處理條件；1993年開發巨峰葡萄冷藏殺蟲處理時，因巨峰葡萄爲東方果實蠅較差之寄主，以網室內强迫產卵方式極不易達到有效殺蟲數，而後即改採人工接卵方式，方可達到輸入國所要求之有效殺蟲數。

2.生物性反應之先前試驗

一連串生物性檢定評估是爲了由多種未成熟或未知的處理方式中，挑選並決定出最具潛力之方法，使日後一系列的研究得以展開，如Balock and Lindgren [3]，Hinman[6]及Burditt *et al.* [4]以100種以上燻蒸劑測試果實蠅，希望求取最合適的燻蒸劑及初步之燻蒸條件。另Armstrong *et al.*[2] 以高溫與處理時間結合的試驗因子，以找尋地中海果實蠅(*Ceratitis capitata* Wiedemann)、瓜實蠅(*Bactrocera cucurbitae* (Coquillett))及東方果實蠅的卵與幼蟲之高溫殺蟲條件。

3.感受性比較試驗

對象害蟲之各齡期對檢疫處理存在著不同的忍受度，本試驗主要在找尋對處理最具忍受性之齡期，並將其當爲探討檢疫處理殺蟲效果(efficacy)的供試齡期。

4.小規模試驗

小規模試驗需廣泛探討檢疫殺蟲處理之可行性，主要包含有害蟲方面的殺蟲效果與果蔬品質上之障害試驗，除此之外，並儘量模擬眞正商業運轉時可能遇到的情形，以增進處理系統的完善性。

5.大規模試驗－認證試驗

大規模試驗是開發檢疫處理的最後一個步驟，必須在商業運轉的情形下進行，一般是將試驗室的感染果(laboratory-infested fruits)均勻分散於處理室內，其餘空間再以未感染的新鮮果堆積至將來商業運轉的裝載量。認證試驗過程中，在檢疫效果上，一定要達到對方輸入國檢疫安全的要求程度；另一方面，果蔬殘毒的檢測得需符合標準。

果蔬品質

採收前的栽培管理所影響的果蔬品質，並不考慮在採收後的障害試驗，障害試驗一般比較檢疫處理前後的外觀、失重、糖度、酸度、硬度及整串的落果率，有些甚至做到成份分析，如夏威夷後處理專家更探討木瓜酵素於處理間的經時變化。

處理方式

(如後述)

簡介主要檢疫殺蟲處理

在植物檢疫處理上有幾個重要名詞需加以說明，如檢疫寄主(quarantine host)：於田間任何作物之某一生長階段可被害蟲自然感染並能供卵孵化及幼蟲生長發育；檢疫處理(quarantine treatment)：單一處理或作用來達到殺死農產品上的害蟲；檢疫處理系統(quarantine system)：結合多種單一處理或作用來達到殺死農產品上的害蟲，亦即複合處理；檢疫安全(quarantine security)：當一地區(infested area)農產品運輸至另一地區(non-infested area)時，檢疫處理或處理系統必須具有極高安全機率能完全殺死害蟲以確保無任何活蟲倖存，而一般安全機率是沿用Probit 9 觀點，如美國規定 100,000隻對象害蟲不能超過 3隻活蟲，即 99.9968%的殺蟲率(mortality rate)，另外日方的要求爲30,000隻對象害蟲不能有 1隻存活。

採收前檢疫處理系統

採收前檢疫處理系統，如有些國家承認pest-free zones 及pest-free growing periods的觀點，而免除嚴格的採收後檢疫殺蟲處理，美國農部審核智利所提出無地中海果實蠅區域(Meditterranean fruit fly-free zones) 的防治計畫書及誘引偵測調查書，於1982年准許該區域水果輸往美國。在澳洲昆士蘭及北方二區域，冬季的五月至八月爲非昆士蘭果實蠅爲害時期(Queensland fruit fly- free growing periods)，此時期盛產的水果可不經檢疫殺蟲處理而輸至維多利亞州。

採收後檢疫處理

1.化學方式

(1)燻蒸

檢疫殺蟲處理方式中，燻蒸除對環境及人類有害外，是屬既方便、經濟又快速的主要方法，目前國際間使用最多且最易接受的燻蒸劑爲溴化甲烷(methyl bromide)，其原理以壓力與溫度直接影響燻蒸劑濃度及燻蒸時間所造成的殺蟲效果。

雖能達到殺蟲目的，但高濃度或長時間易傷及果蔬品質或造成藥劑殘留，如利用減壓燻蒸方式 (negative-pressure atmosphere fumigation) 增加滲透作用並減低劑量及縮短燻蒸時間，希望將果蔬傷害減至最低。

(2)殺蟲藥劑

檢疫上殺蟲劑使用方法一般爲噴灑或浸泡，亦有摻併於果臘以達到殺蟲目的。殺蟲藥劑因殘毒問題較不能爲消費者接受當成果蔬檢疫殺蟲處理的主要或單一方式，但卻廣泛的應用於花卉及苗木檢疫消毒處理上，如本省生產的馬拉巴栗(*Pachira macrocarpa*) 輸往韓國，必需先以藥劑浸泡消毒，方能裝櫃輸出。

(3)精密氣調處理

CA (controlled atmosphere) 乃利用降低氧氣濃度及提升二氧化碳或氮氣濃度以達到殺蟲效果，是屬於一種安全性的化學方式－不會造成殘毒、易燃及易爆等物質產生。

CA雖具安全性，但作用處理時間過長，經常要耗時數週至數個月才能收效，因此，早期大部份施用於穀物的倉儲處理。在果蔬檢疫殺蟲處理上，一定要選擇耐貯藏的種類，像蘋果與梨置於低溫下，並配合CA處理可增長果品本身保存時間，又可達成檢疫上之要求。

2.物理方式

(1)低溫冷藏處理

90年代初期，低溫冷藏處理就已被使用於果蔬殺蟲方面，沿用至今在操作技術與試驗資訊都相當完善。其基本原理主依檢疫害蟲各齡期對低溫冷藏條件(冷藏溫度與時間的關係)之忍受反應。如本省輸日椪柑對東方果實蠅的低溫冷藏條件爲0-1℃貯藏14天。

當溫度於10℃以下即可對熱帶果實蠅的幼蟲及卵造成殺傷效果，但眞正具殺傷力之溫度最好低於5℃，美國農部植保檢疫處理手冊(plant protection and quarantine treatment manual, 1985)更嚴苛規定處理最高溫度不可超過2.2℃，以免爲達到檢疫殺蟲效果而延長冷藏時間所產生的果蔬障害。

大體而言，低溫冷藏處理較適合用於溫帶水果，因冷藏時間過久或溫度過低極易造成熱帶水果的傷害。由於低溫冷藏處理較其它方法耗時，因此，很多國家大量水果外銷常利用長途航運的船艙低溫冷藏處理來取代陸上冷藏處理以爭取時效。

(2)高溫處理

目前高溫殺蟲處理有：溫湯處理(hot-water immersion treatment)、蒸熱處理(vapour heat treatment)及熱空氣處理(forced hot-air treatment)，可依果蔬種類、大小、熟度、加熱時裝載的容器型式及傳熱介質等特性愼選處理方式。

高溫處理是一種易操作、具時效及無化學殘毒的方法，但極易產生果蔬的熱傷害，此法雖可迅速達到殺蟲效果，然而加熱是否能在適合時間內，均勻將熱能傳導到分散的果蔬上，會直接影響殺蟲條件及果蔬障害問題。

(3)其它

微波(microwaves)、放射線(irradiation)及高低壓處理(high and low pressures)等方式如同時要考慮檢疫上殺蟲效果及商業價值的果蔬品質二方面，則需進一步研究收集更多基本資料，期待日後能普遍用於商業性的果蔬殺蟲處理上。

採收後檢疫處理系統(postharvest quarantine systems)－複合處理

從採收後的選果、包裝、貯藏、殺蟲處理、運輸過程及果蔬品質的保存等因素，常取各單一處理的優點，結合成一最適合的商業性檢疫處理系統。一般較常用有：

1. 燻蒸結合高溫或低溫的複合處理：當溫度升高時，則可減少劑量及縮短燻蒸時間。經燻蒸後，再經低溫冷藏處理可殺死地中海果實蠅、東方果實蠅及瓜實蠅寄生於果蔬上的幼蟲[8]，此複合處理能減短冷藏處理時間。

2.高低溫複合處理：如後熟特性的木瓜，先選擇未超過1/4熟度(one-quarter ripe)果實，經49℃溫湯處理20分鐘，再以8－9℃低溫冷藏10天，如此可殺死木瓜上的果實蠅，又能使果實表面在處理條件下正常轉色[5]。

目前本省外銷果蔬檢疫殺蟲處理開發情形

植物檢疫上，各國可能依疫情、病蟲害的風險評估及國內農產品的保障，而對進口之檢疫處理條件不盡相同，在此介紹我國針對鮮果外銷量最大國－日本之果蔬檢疫處理開發流程。

自1984年 EDB (ethylene dibromide) 禁用後，政府即積極開發以無化學污染的物理方法－低溫冷藏及高溫處理，其開發流程如圖一。

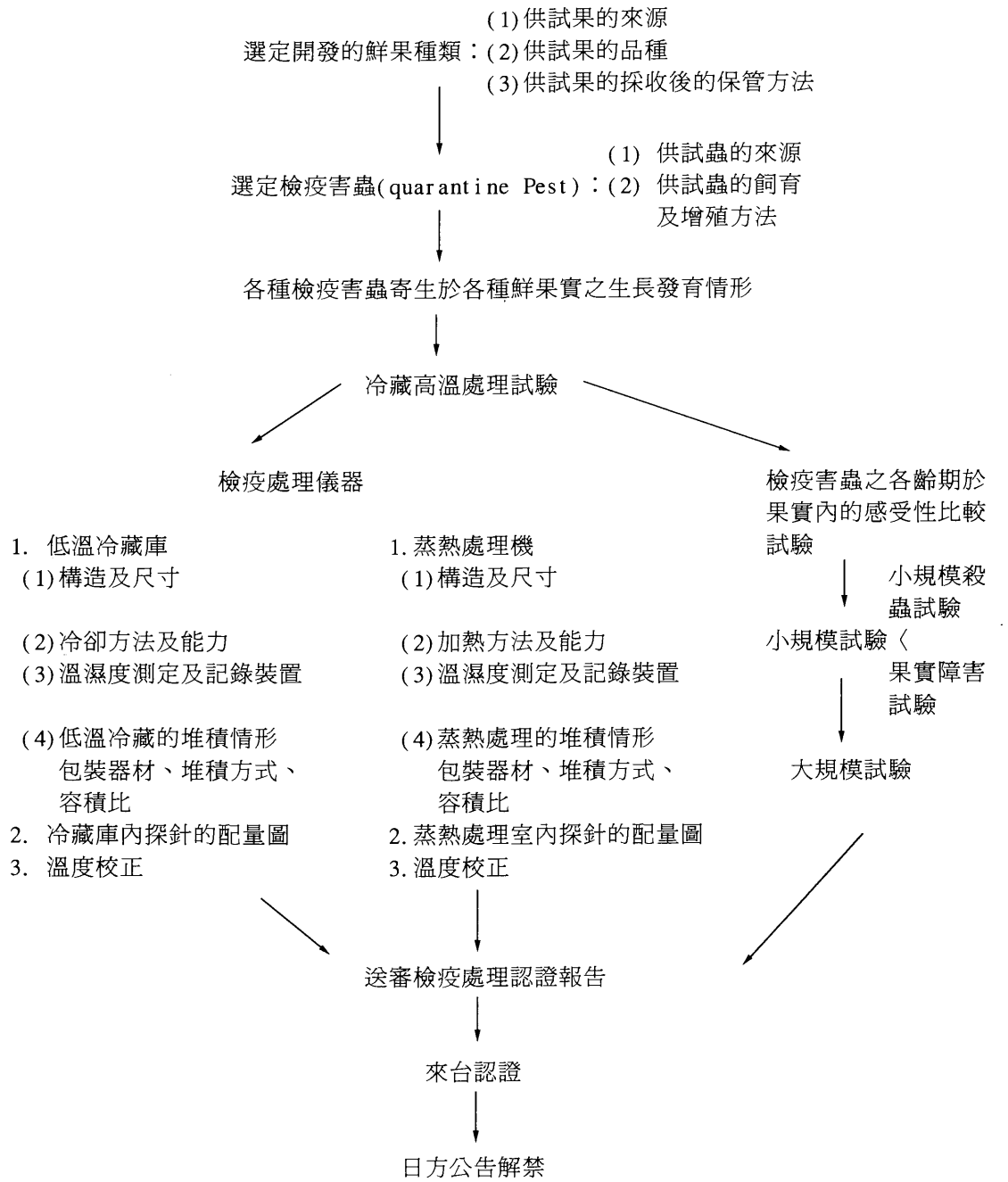


圖 1. 開發輸日鮮果冷藏、高溫殺蟲檢疫處理條件流程圖。

近年來經日本政府認証成功的檢疫殺蟲處理方法有荔枝高低溫之複合處理、芒果蒸熱殺蟲處理及椪柑低溫冷藏殺蟲處理。其檢疫殺蟲處理條件如表一。

表一、臺灣輸日鮮果種類及其檢疫殺蟲處理條件

Table 1. Quarantine disinfestation schedules using VHT and cold treatment against insect for exportation of Taiwan fresh fruits

果蔬種類	處理方法	檢疫條件	解禁年度
荔 枝	Vapor Heat-Refrigerate Treatment	1. Vapor Heat Treatment: 果心溫度46.2℃維持20分鐘 2. Refrigerate Treatment: 果心溫度2℃維持42小時 3. 蒸熱處理在果心溫度46.2℃維持20分鐘，於6小時內使果心溫度降至2℃維持42小時 4. Pattern:30℃ 30min.→30℃ 45min.→41℃ 10min. →46.2℃ 20min.→46.2℃ Shower to 30℃	March, 1988日本農林水產省公示No.326
椪 柑	Cold Treatment	1. 果實中心溫度:1℃ 2. 貯藏時間:14天	同 上 March, 1988
愛文檬果 海頓檬果	Vapor Heat Treatment	1. 飽和濕度 2.Vapor Heat Treatment:46.5 ℃ 30 min. 3. Pattern:30℃ 30min.→30℃ 45min.→41℃ 10min.→46.5℃ 30min.→46.5℃ Shower to 30℃	日本農林水產省公示 No.944 Jul.8. 1988, 1991

結　論

果蔬檢疫處理的開發，所涉及的範圍相當廣：殺蟲方面－昆蟲學；果蔬品質－園藝學；處理方式－處理儀器的農機學；化學藥劑－農化學、毒理學；商業包裝及運銷學等。在農業發達的國家，都會成立一個專司機構來從事研究開發，而反觀國內自運用EDB於果蔬檢疫處理技術至今已有25年的歷史，尚不能有系統、循序漸進的建立一個良好的研究環境和機構，僅是應急、搶時效的打開盛產果蔬種類之外銷市場，故往往只單一考量達到 Probit 9 的殺蟲效果，而忽略了果蔬品質或處理流程的實用性及廣泛性。希望不久的將來，國內亦能成立植物檢疫處理的研究機構或統

簫單位，嘉惠農民，因應GATT時代之到來。

參考文獻

1. 郭麗生。1988。外銷鮮果檢疫處理技術。中華昆蟲特刊第二號果樹害蟲綜合防治研討會 133-139頁。
2. Armstrong, J. W., Schneider, E. L., Garcia, D. L., Nakamura, A. N. and Lines, E. S. 1984. Improved holding technique for infested commodities used for Mediterranean fruit fly quarantine treatment research. J. Econ. Entomol. 77: 553-555.
3. Balock, J. W. and Lindgren, D. L. 1951. Toxicity of various compounds as fumigants to eggs and larvae of the oriental fruit fly. J. Econ. Entomol. 44:657-659.
4. Burditt, A. K., Jr., Hinman, F. G. and Balock, J. W. 1963. Screening of fumigants for toxicity to eggs and larvae of the oriental fruit fly and Mediterranean fruit fly. J. Econ. Entomol. 56:261-265.
5. Couey, H. M., Linse, E. S. and Nakamura, A. N. 1984. Quarantine procedure for Hawaiian papayas using heat and cold treatments. J. Econ. Entomol. 77: 984-988.
6. Hinman, F. G. 1954. Screening tests of compounds as fumigants for eggs and larvae of the oriental fruit fly. J. Econ. Entomol. 47:548-556.
7. Robert E. Paull and J. W. Armstrong. 1994. Insect pests and fresh horticultural products: treatments and responses. CAB INTERNATIONAL, Wallingford, UK.
8. Seo, S. T., Kobayashi, R. M., Chambers, D. L., Steiner, L. F., Balock, J. W., Komura, M. and Lee, C. Y. L. 1971. Fumigation with methyl bromide plus refrigeration to control infestations of fruit flies in agricultural commodities. J. Econ. Entomol. 64:1270-1274.
9. Sharp, J. L. and Gould, W. P. 1994. Control of Caribbean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in grapefruit by hot air and hydrocooling. J. Econ. Entomol. 87(1):131-133.
10. Sommer, N. F. and Mitchell, F. G. 1986. Gamma irradiation - a quarantine treatment for fresh fruits and vegetables? Hortscience 21(3):356-359.
11. Winkelman, P. M. and Williamson, W. P. 1990. Advances in commercial dry heat disinfestation of papaya. ASAE paper No. 90-6016.
12. Yokoyama, V. Y. and Miller, G. T. 1993. Pest-free period for walnut husk fly (Diptera: Tephritidae) and host status of stone fruits for export to New Zealand. J. Econ. Entomol. 86(6): 1766- 1772.

Quarantine Treatment for Disinfestation of Fresh Fruits and Vegetables

Fang-Chi Chang, Hung-Yie Chen and Jyh-Shyang Lin
Taichung Branch Office, Bureau of Commodity Inspection and Quarantine, Ministry of Economic Affairs

Abstract

Quarantine treatments are required for fresh horticultural commodities moving through marketing channels from infested to non-infested areas to prevent further distribution of the pests. An approved treatment schedule consists of all the conditions, parameters and procedures needed to meet a specific quarantine treatment that adequately disinfests pest organisms at the required level of quarantine security without adversely affecting the commodity. The research and development of postharvest quarantine treatments, including chemical methods (fumigation, insecticides and controlled atmospheres treatments), physical methods (cold and heat treatments) and combination treatment.

Key words: quarantine treatment, fruit, vegetable.

「植物保護新科技研討會」專刊
臺灣省農業試驗所特刊第57號 pp. 117-132 (1996)

誘殺劑應用上之數項問題

朱 耀 沂
臺灣大學植物病蟲害學系

摘要：誘殺劑爲害蟲發生量之偵測或實際防治上利用價值甚高的資材。然爲提高其應用時之準確度及防治效果，必須瞭解其與接觸性殺蟲劑之異同處。本文特就 1)誘殺蟲數與誘殺率， 2)有效期間與有效範圍，3)誘殺速度及 4)誘殺曲線之分析等四項加以討論。誘殺率相當於一般殺蟲劑效果測試時之殺蟲率(死亡率)，爲誘殺劑效果評估中不可忽略之項目。有效期間與有效範圍之測定上，必須要注意誘殺效果通常隨日期或距離之遠近或長短而逐漸消失，並非到了所定之有效日期或距離時效果突然全失。在過去的誘殺措施中，常只記錄誘殺蟲數而未重視誘殺蟲之內容及品質，即所誘殺蟲之性別、日齡等應也列入記錄事項才是。尤其在利用誘殺劑之滅雄處理中，必須將雄蟲在其未與雌蟲交尾前誘殺才能得到最佳之防治效果。即對雄蟲在交尾前之誘殺速度評估也爲誘殺害蟲措施中不可忽略之一環。另在誘殺害蟲之過程中，誘殺蟲數之多寡常產生變化。從誘殺蟲數曲線之分析判斷誘殺措施之應變，乃值得深入討論之事項。

關鍵詞：誘殺劑、誘殺蟲數、誘殺率、有效期間、有效範圍、誘殺速度、誘殺曲線。

前 言

利用誘殺劑防治害蟲之嘗試在國內外已有多年之經驗，其中有些防治工作確實收到相當令人滿意的成績，但也有不少工作未能得到預期之效果。究其原因無非是所用之誘殺劑成份、藥量、誘殺器之構造、懸掛數、懸掛位置之不當等等，甚至在使用時之氣侯、植被條件等等都能影響誘殺效果。固然影響因子甚多，在此特就未能收到預期效果之工作實例中，找出一些可能常爲我們所忽略之數項問題共同討論，以供將來改善誘殺方法之參考。

誘殺蟲數與誘殺率

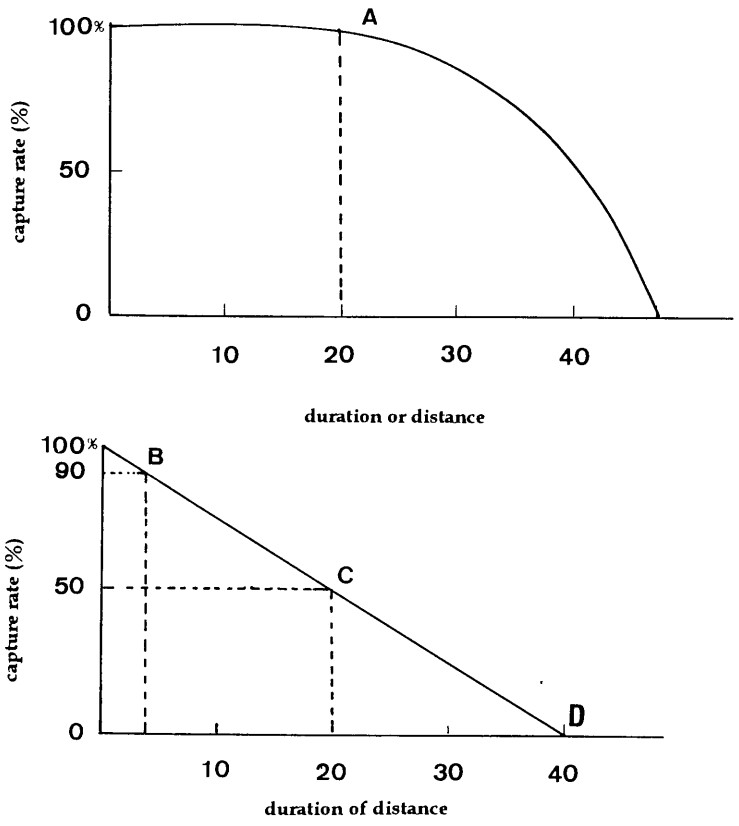
在誘殺法之效果評估上，我們常以誘殺蟲數爲指標。即誘殺蟲數多時判定爲該誘殺劑甚至該方法良好。反之，則認爲該防治方法不佳。在試驗田中之害蟲密度確實是影響誘殺蟲數之關鍵因子，因爲害蟲密度高時自然可誘殺較多之蟲數，反之則必然較少。從此亦知；誘殺蟲數之多寡，不但因誘殺方法而異，也因害蟲之發生量有很大的差距。換句話說，誘殺蟲數之多，是否由害蟲發生量之多所致，或是誘殺方法之適宜所致甚難判斷。總之；單憑誘殺蟲數僅能評估誘殺法之部份效果。

再從另一角度考量，誘殺蟲數相當於一般殺蟲劑效果試驗中之死亡蟲數。正如施用供試藥劑後，雖見到數百之死亡蟲，並不能判斷該藥劑爲有效或無效，而仍必需調查未死的害蟲數，才能

判斷其殺蟲效果。即若發現數百之死亡蟲，而此等死亡蟲佔總蟲數之大部份，此時才可認定該殺蟲劑爲效果極佳者。反之，若仍有數千、數萬之活蟲數，仍得認爲該殺蟲劑之效果不佳。吾人必需以活蟲與死蟲之比率(死亡率或殺蟲率)評估該殺蟲劑之殺蟲效果。在誘殺劑之效果評估上也是相同的。雖然誘殺到數百之蟲，但在該誘殺劑誘殺有效範圍內到底還有多少未被誘到之蟲？若缺乏相當於死亡率之誘殺率資料，實在甚難評估其效果。

有效期間與有效範圍

誘殺劑的有效期間與有效範圍之測定是決定換藥期或誘殺器之設置數上不可或缺的項目。但以往吾人對此問題常保持全有或無(all or none)之概念。即文獻或某個資料上，記載其有效期間爲20天或有效距離爲20公尺時，往往即認爲該誘殺劑在20天內或20公尺內之藥效完全相同，而超過20天或20公尺時，藥效即忽然全失。其實有效期間及有效範圍之測定法有多種，且所得數值依測定方法而異。有人以誘殺率降到90％或50％或以誘殺率開始明顯下降時爲有效期間或有效範圍，由此亦可知誘殺率爲應用誘殺劑時之重要指標。但藥效是隨時間及距離逐漸減少的，絕非到了某一定點或時間時就突然全部消失。有效期間及有效範圍不但因測定方法而不同，且隨當時之氣候、地形條件等有很大的差異。其影響情形大致如圖一，藥效隨日數及距離呈直線或曲線狀減少。



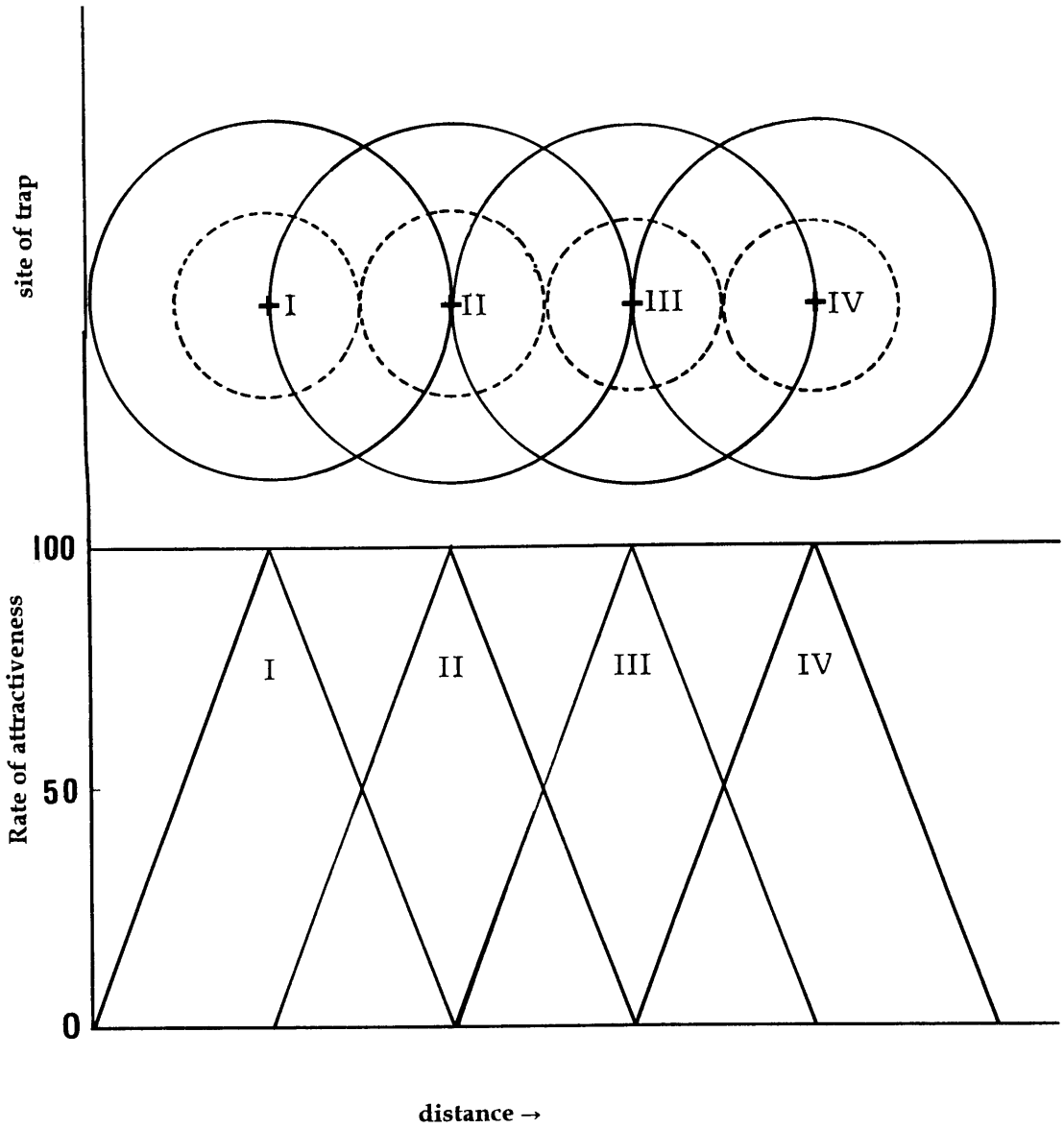
圖一、誘引藥效隨日數及距離之變化模式圖。

Fig. 1. The trend of the decrease of attractiveness with duration or distance.

在此只就有效期間而言，藥效(即誘殺率)如圖一之上圖，至某一時期(A)後開始突然降低。當然也有先下降然後保持穩定者，或略呈直線狀下降者，依有效成分、劑型而異。就誘殺率與日數或距離之對機數分析(probit analysis)結果，假設其關係呈直線狀逐漸降低時再加以說明；此時以誘殺率降到90％時(B)或降到50％(C)時－各相當於殺蟲劑致死量之LD_{90}及LD_{50}(可能依試驗目的而異)，甚至誘蟲率降到0時之D點爲有效期間或有效距離也可視情形而決定的。然無論如何誘蟲率及誘殺劑藥效是隨時間及距離逐漸降低是不容否定的事實，但絕不會如圖中之點線所示，到了某一定點或時段突然消失。此種概念在利用性費洛蒙劑於害蟲之大量誘殺時也甚爲重要。吾等已知，在一定之性費洛蒙濃度範圍內，害蟲才會產生被誘引反應，過低時當然不反應，但過高時卻導致迷惑效果(confusion effect)。因此，在整個施用田中如何長期維持有效地誘殺害蟲而不致迷惑它們的固定濃度，是實施大量誘殺法時成敗關鍵之一。

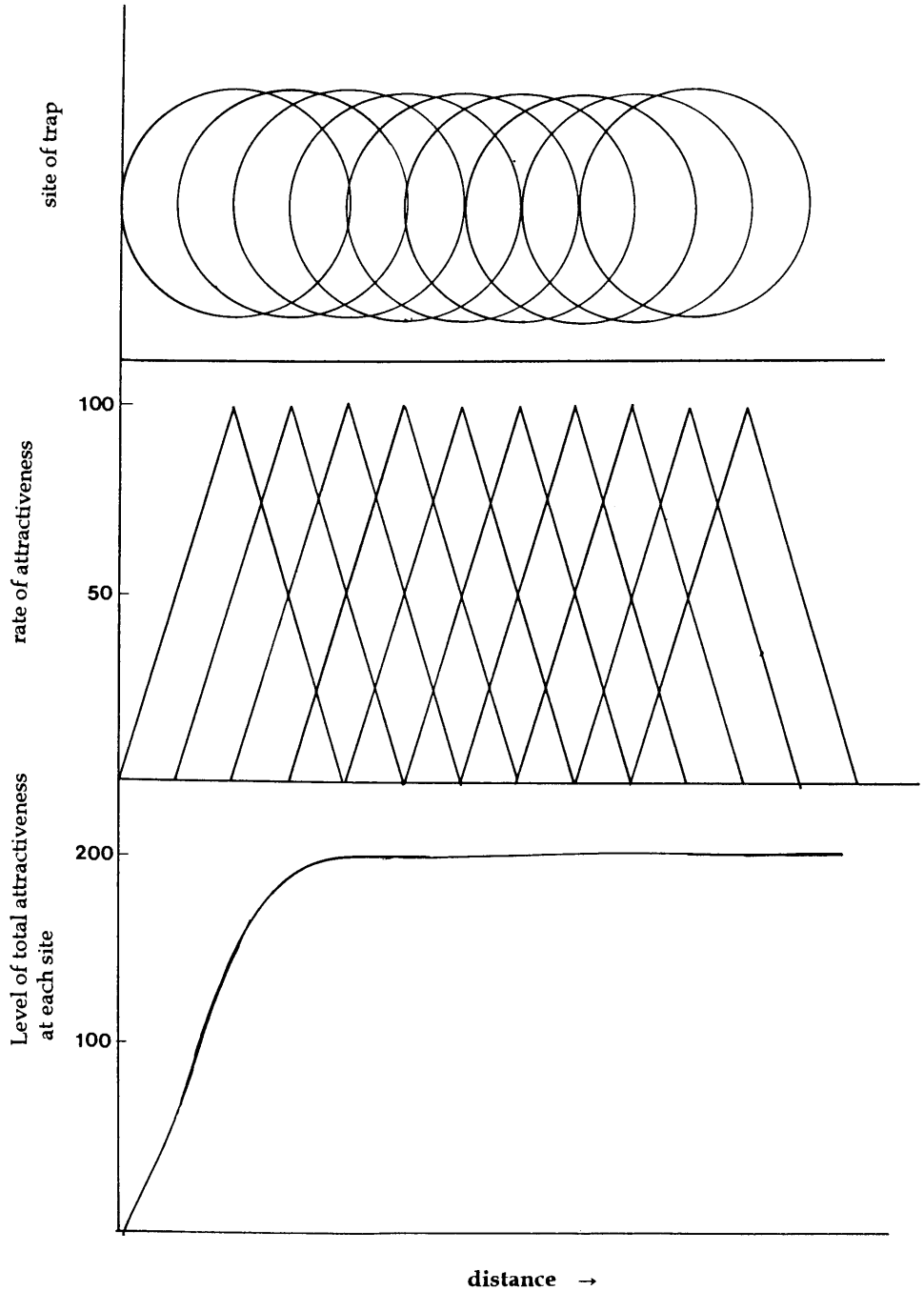
由於誘殺劑之有效範圍受到環境因子如地形、植被、風向等之影響，通常在田間並不呈圓形發散，然在此爲方便說明起見，暫用圓形表示有效範圍，並假設誘蟲效果爲直線狀降低，另以點線及實線分別表示降至一半及完全消失的範圍。此時若以降至一半之範圍爲它的有效範圍，而在各有效範圍的距離排列誘蟲器時，在施用地區點線範圍內之誘蟲指數皆爲100單位，理論上可使人滿意(圖二)。然此種現象只發生於剛設誘蟲器時。隨時間之經過，有效範圍縮小，A線(圖一)表示之累積誘蟲效果也逐漸降低，爲了彌補此缺點，如果以誘蟲率降到原來之75％時爲有效範圍，並以有效範圍的二分之一距離設置誘蟲盒時即成圖三。此時就第4號之誘蟲盒而言；除它本身之誘蟲效果外，在它完全消失誘蟲力之有效範圍內(斜線部分)，還參有第1、2、3、5、6、7號誘蟲盒之誘蟲力。如此第四號誘蟲盒有效範圍內之誘蟲效果在誘置初期已遠超過單一誘蟲盒之誘蟲效果，而致使害蟲發生迷惑現象。因此在應用大量誘殺法前，應先開發揮發速率極穩定的費洛蒙吸附劑，然後測定誘蟲率降爲50％之有效範圍才行。再若考慮誘蟲效果之逐日衰退的原因，問題可能會更複雜。若20天後誘殺效果降到一半，而此間呈直線的相關時，如圖四(I)，施用當時有效範圍尙可涵蓋大部份的處理區，但隨施用日數之經過，所涵蓋之有效範圍逐日縮小(圖四II、III)。此趨勢也如圖五，以累積誘引效果表示更爲清楚。即如圖五(I)，設置當天之累積誘引效果普遍的保持100，但10天後誘引器設置地點之效果減爲原來之75％，而最低處只有原來之一半。至誘引效果減到一半之所謂有效期間到期時，在誘蟲器設置地點只有原來一半之效果，兩個誘蟲器有效範圍邊緣接觸地方之誘引效果成零，此時誘蟲效果最高者爲原來之一半，最低處即爲零。如此由於誘殺劑有效範圍逐日縮減，在處理範圍內愈難保持一定之有效濃度。在日後之誘殺法應用上如何克服此等困難乃待以後之研究。但以超高濃度之性費洛蒙，使害蟲引起迷惑作用之交信擾亂法之應用上，則較無此方面之困擾。

誘殺劑誘引效果之逐日衰退之概念在東方果實蠅之誘殺上也甚爲重要。利用含毒甲基丁香油之誘殺方法大致可分兩大類，一爲燈型誘蟲器之利用，另一爲誘殺板。前者將誘引劑置放於容器中，較不易受風吹雨打之影響，但有效成分之揮發受到誘蟲器外壁之阻礙也較不易外溢。因此，就使用同一劑量之誘殺板比較，燈式誘蟲器之有效期間較長爲其一大優點。有些誘蟲器甚至採用較小的揮發面更可延長其有效期間。一般認爲此種誘蟲器之有效期間至少有2個月，甚至達3個月之長。至此時即更換誘蟲器中之誘引劑，使它恢復原來之誘引力。由於此時只更換或添加誘殺用之藥劑，對誘蟲器之設置數未有任何變化。並如圖六，此間誘蟲效力之變動，在設置當天時之100單位至50單位之間。若要減小誘蟲效力之變化範圍並維持高單位之誘蟲效力，必需縮短換藥



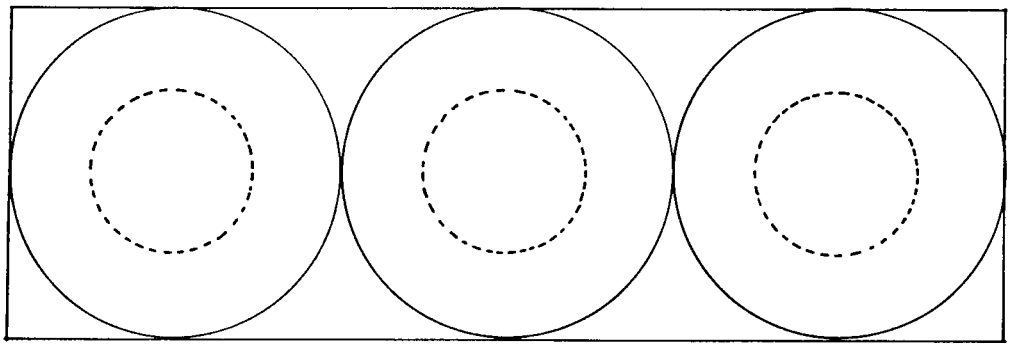
圖二、以誘蟲率降爲50% 時爲有效半徑(以虛線表示)。以直徑爲間隔排列誘蟲器時，每一地點之累積誘蟲效果。實線表示誘蟲效果全失之範圍。

Fig. 2. The rate of attractiveness at the treated area where 4 traps are set in the grids of attractant efficacy decrease to half. Steaded line show the range all the efficacy disappeared. Dotted line show the range efficacy decrease to half.

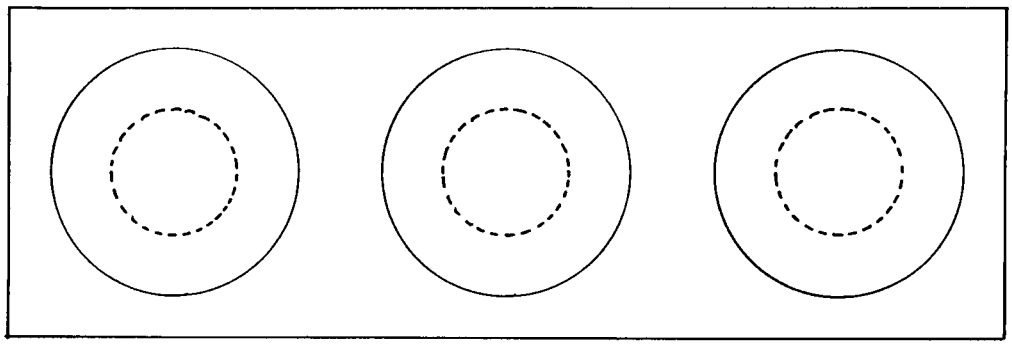


圖三、以誘蟲率降爲75% 時爲有效半徑，以半徑二分之一之間隔排列誘蟲器時，每一地點之總誘蟲效果指數(模式圖)。

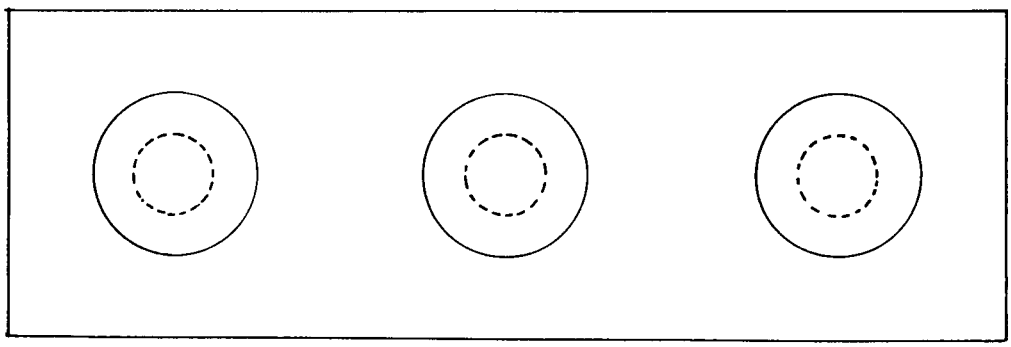
Fig. 3. The rate and level of total attractiveness at each site of the treated area where traps are set in the grids of attractant efficacy decrease 25%. In the almost treated area, the level increase to the double of single trap.



I The 1st day of the application



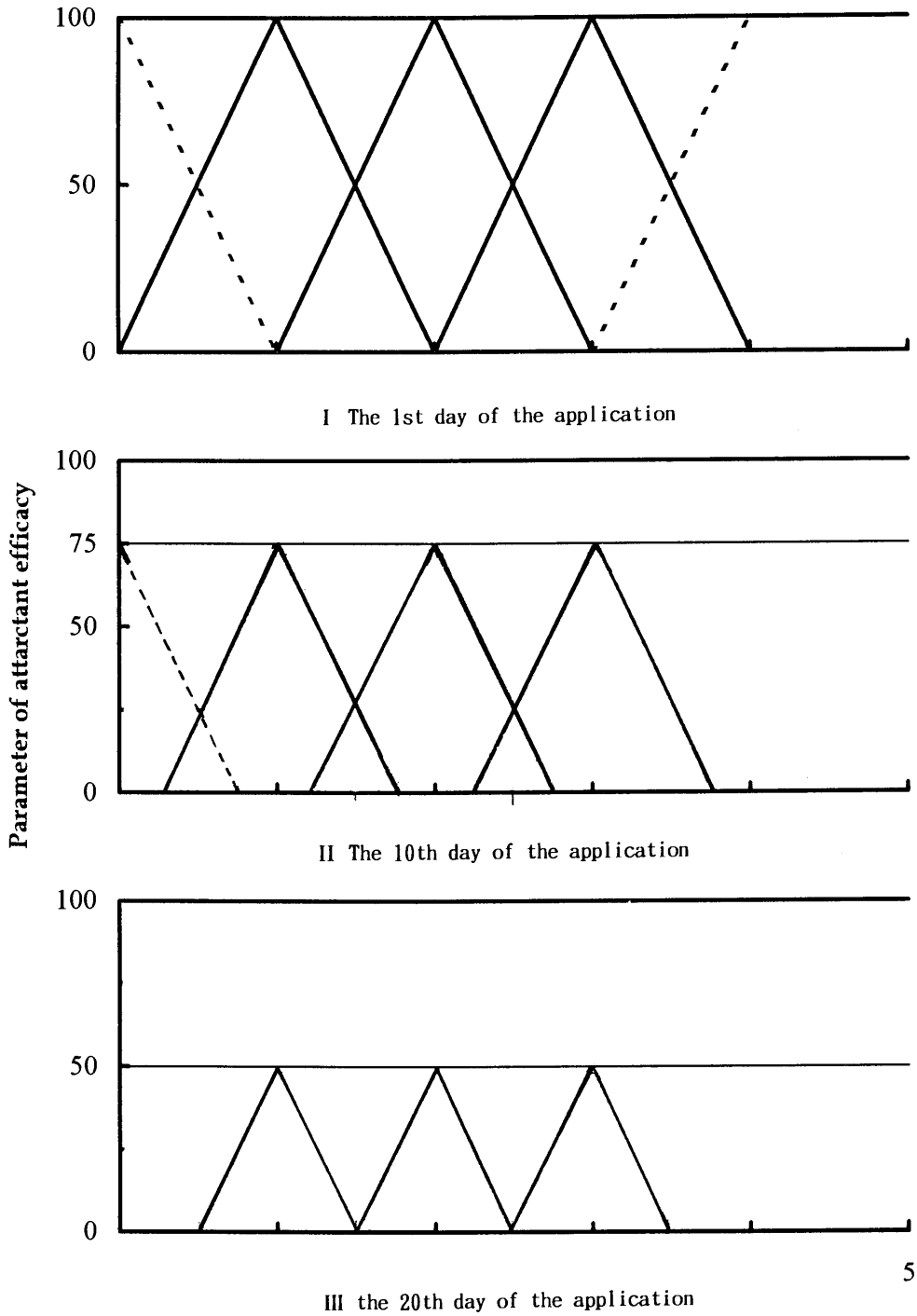
II The 10th day of the application



III the 20th day of the application

圖四、當有效期間設定爲20天時，設置當天、10天、20天後誘殺範圍之變化。實線表示誘蟲力全失之範圍，點線表示誘蟲力降低一半之範圍。

Fig. 4. The change of active range with the duration passed. Steaded line show the range all the efficacy disappeared. Dotted line show the range efficacy decrease to half. The range is imagined to decrease to half after 20 days.

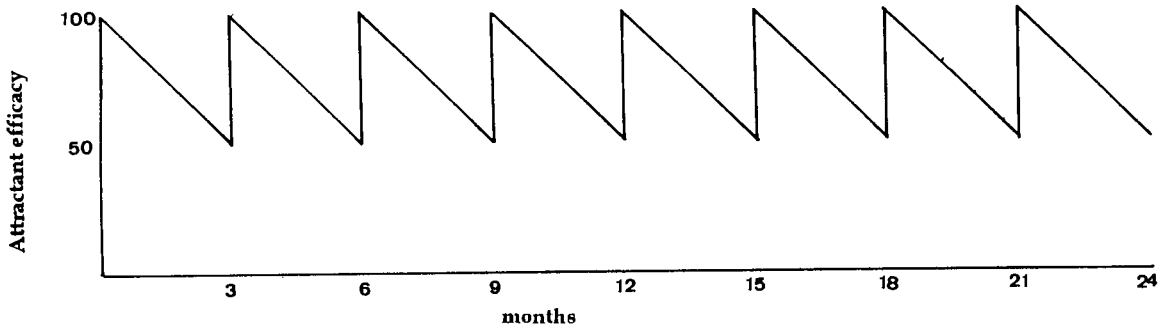


圖五、當有效期間設定爲20天時，設置當天、10天、20天後誘殺範圍內累積誘殺效果之變化(模式圖)。

Fig. 5. The change of total attractant efficacy at the each site of the treated area on the 1st, 10th and 20th day after the application.

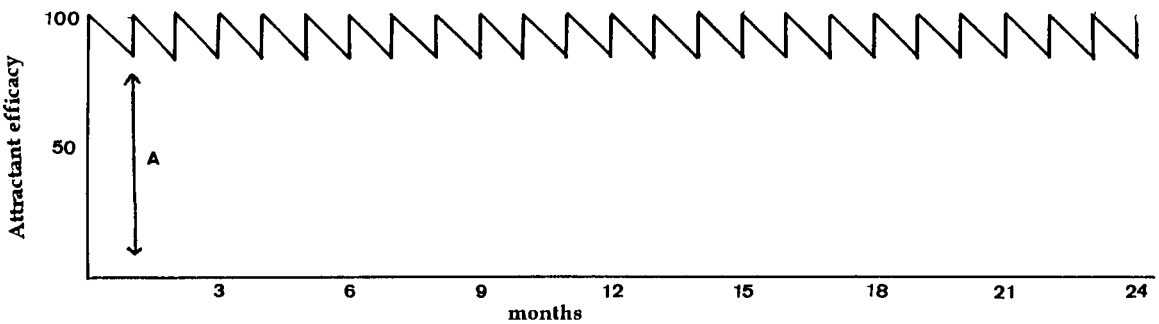
期間而將換藥期間縮短爲一個月時之情形如圖七，大多維持100～80單位之高度誘蟲效力，但此時已失去誘蟲器本身之長效性，並每次換藥時尙有85％之誘蟲劑尙未揮發，勢必產生誘蟲劑之大浪費。

所謂誘殺板之使用，爲將纖維板浸漬於含毒甲基丁香油，以鐵絲懸掛於樹枝上，如此任它風吹雨打，由於其表面積(揮發面)較大，易喪失效果，一般認爲其有效期間頂多爲爲兩個月。因此兩個月後在必須加掛一些誘殺板。如此經第一次之加掛，以後每兩個月加掛一次。由於此時第一次懸掛之誘殺板仍在原地，並還有一半(50單位)之誘蟲效力，與加掛誘蟲板之100單位，共可揮發150單位之誘蟲效力。此後誘蟲效力又逐漸減低，兩個月後降爲一半之75單位，但經第二次加掛後增加到175單位，如此理論上在每次加掛中誘蟲效力呈階段式昇高(圖八)。誘殺板與燈式誘蟲器之誘殺效力變化比較時即得圖九。從圖中可知，後者之誘殺效力於開始設置1～2個月，略高於前者，其後之效力則遠不如誘殺板。以往我們曾使用燈式誘蟲器防治東方果實蠅，其部分原因源於誤認誘殺效果到了有效期間後就忽然全失之錯誤觀念。



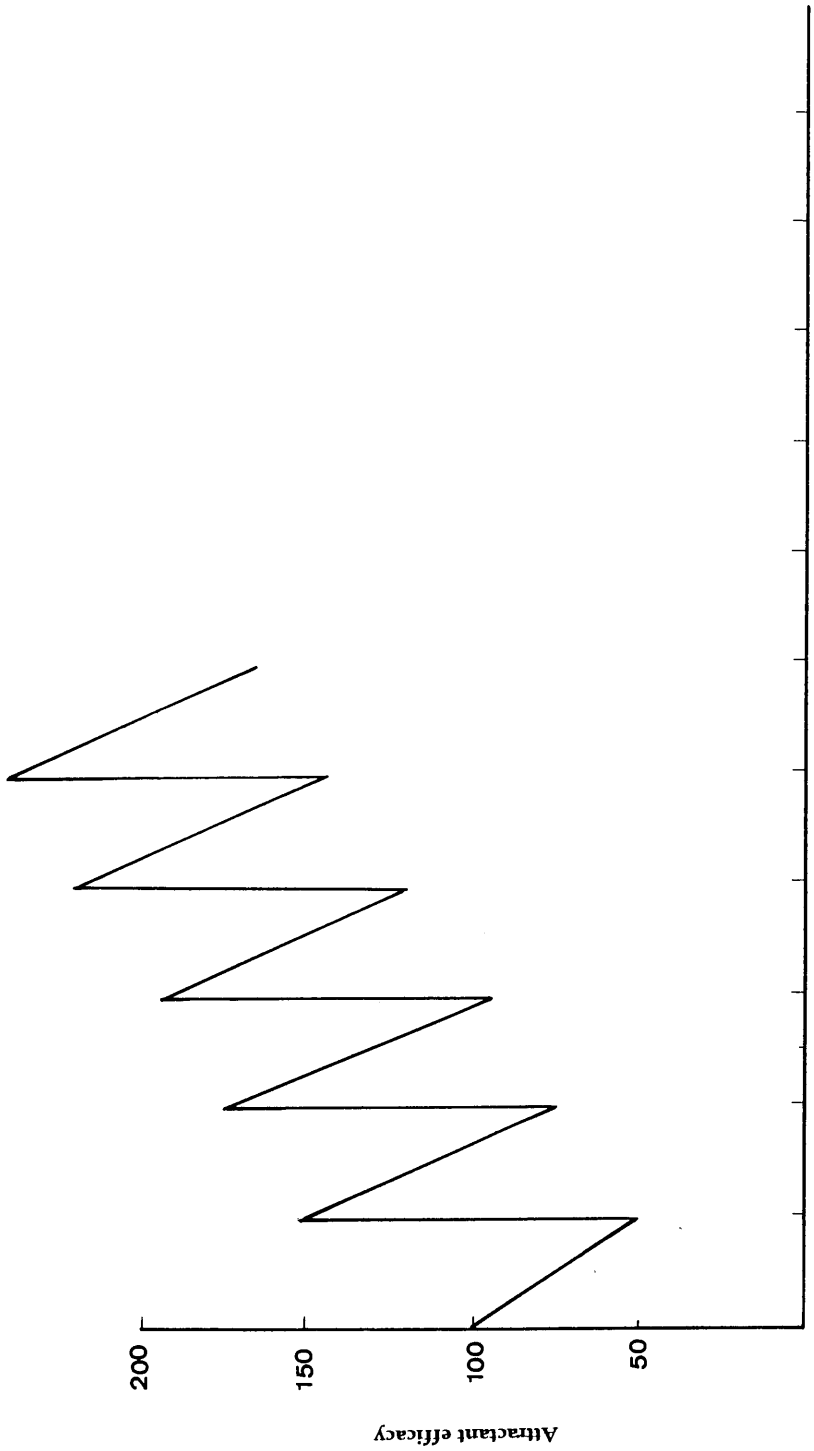
圖六、燈式誘蟲器誘蟲效力之變化。誘蟲效力經三個月後減爲一半，並每三個月換藥一次時之變化。此時誘蟲效力在100至50單位間變化。

Fig. 6. The change of attractant efficacy of lantern type trap. The efficacy is imagined to decrease to half after 3 months. The attractant is renewed every 3 month. Then the efficacy flactuate between the level of 50 and 100.



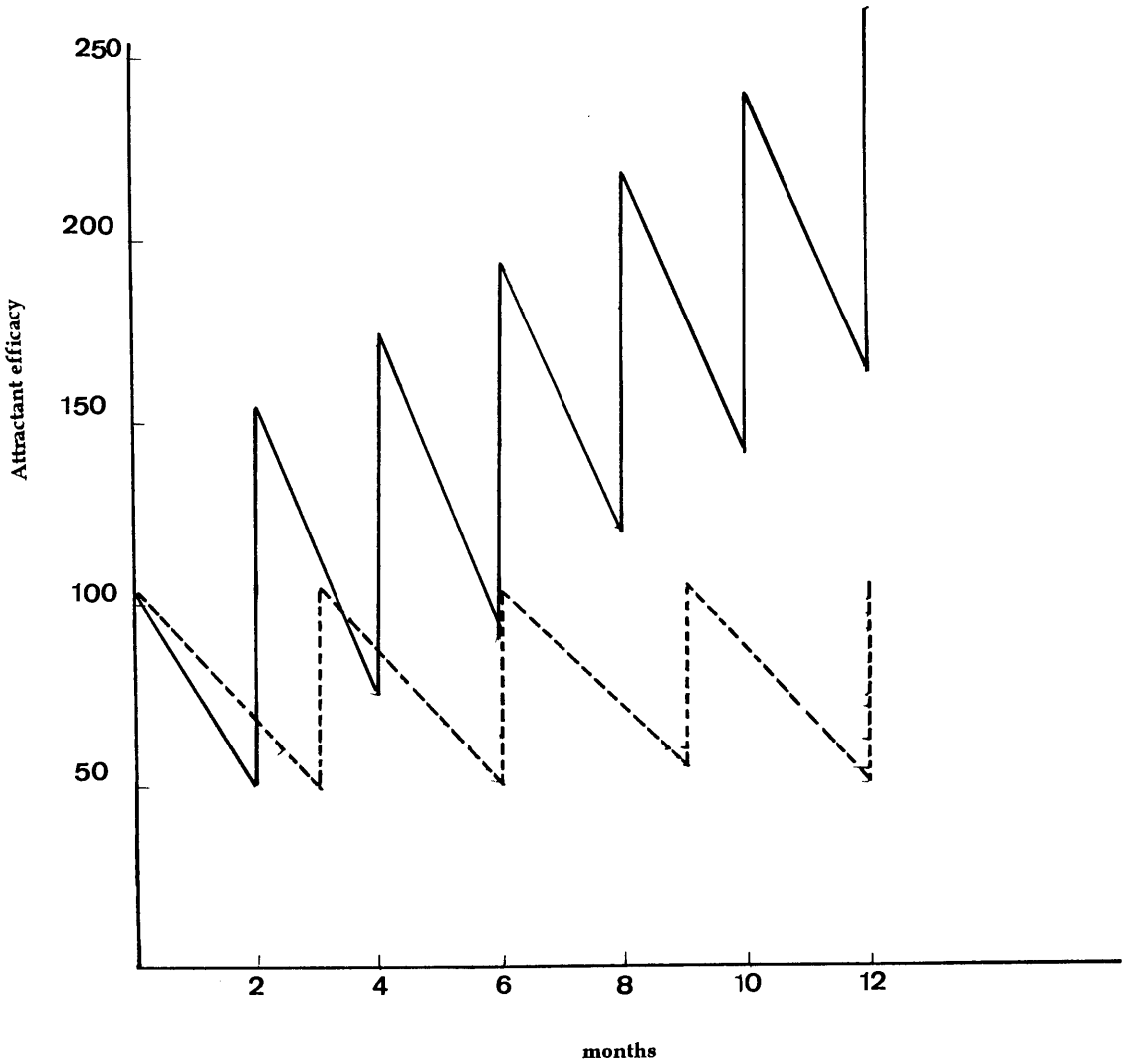
圖七、燈式誘蟲器誘蟲效力之變化。誘蟲效力經三個月後減爲一半，並每一個月換藥一次時之變化。此時誘蟲效力可維持在100至85單位之間。但此時仍約有85%之誘蟲劑存在，換藥造成誘蟲劑之浪費(A部份)。

Fig. 7. The change of attractant efficacy of lantern type trap. In the case, the attractant is renewed every month. The change of efficacy become more stable and flactuate between the level of 85 and 100. But much attranctant (A)is wasted.



圖八、誘殺板誘蟲效力之變化。誘蟲效力經二個月後減爲一半，並每二個月加掛一次時之變化。由於採加掛式，並不造成誘蟲劑之浪費，且誘蟲效力呈階段式的增加。

Fig. 8. The change of attractant efficacy of poisoned fiber board. The efficacy is imagined to decrease to half 2 months. New fiber board is added every 2 month. In this manupulation, the previously applied board still remain in the field. Therefore, not only didnot induce the waste of the attractant, but also the total efficacy increase as each additional application.



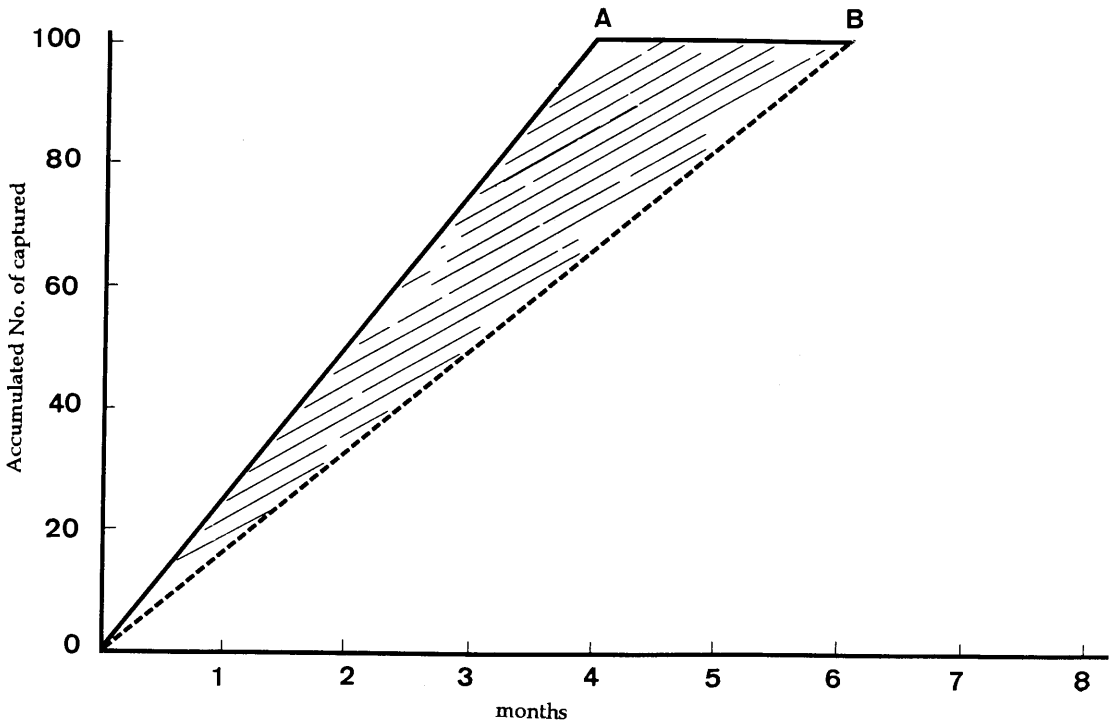
圖九、燈式誘蟲(虛線)與誘殺板(實線)誘蟲效力變化之比較(採自圖六與八)。

Fig. 9. The comparison of total attractant efficacy between poisoned fiber board (stead line)and lantern type trap (dotted line).

誘殺速度

在害蟲防治之過程，我們常重用速效性之殺蟲劑，因爲速效性殺蟲劑在短時間內殺死害蟲，使爲害量不致繼續增加。在東方果實蠅之滅雄防治過程中，則是將東方果實蠅雄性成蟲在它與雌蟲交尾前誘殺，以減少交尾雌蟲率爲目的。換言之，必須在雄蟲交尾前將之誘殺才能收效。更具體的說；雄蟲之被誘殺蟲數固然重要，但更重要的爲誘殺更多的未交尾雄蟲。如此可知；在它交尾前如何迅速誘殺它，才是滅雄法成敗之關鍵。就曾經一段時期推廣使用之燈式誘殺器與誘殺板

比較其利弊，誘殺板的揮發面積大；即如前述在短期內揮發大量的有效成份，因此雖然有效期間較短，但具有較強力及廣大的誘殺力和誘殺範圍。而燈式誘蟲器的揮發面小且部分揮發成分之分散爲容器所阻，影響有效成份之外溢。如此雖可延長有效期間，但必然縮小有效範圍。由此可預期誘殺板之誘殺速度遠大於燈式誘蟲盒。如果使用相同的藥量且預期最後之累積誘殺蟲數是相同時，累積蟲數之增加趨勢卻有明顯差異(圖十)。圖中之實線部份爲誘殺板之誘殺蟲數曲線，由於有效範圍較大，誘蟲數急速地增加，但到了A點，大致耗盡有效成分，累積蟲數不再增加。然於燈式誘蟲器有效成分之揮發較爲緩慢，誘殺蟲數之增加亦較慢但維持較久，一直增加到B時才失去誘殺效果。雖然最後之誘殺蟲數是相同，如斜線部份表示，以兩種方法誘殺時每一時段仍在活動的雄蟲數上就有差異，此種雄蟲在被誘殺前無疑地就與雌蟲有交尾的機會，如此大幅影響滅雄之效果。從此亦知，在我們的誘殺策略中未能注意誘殺速率及誘殺蟲之內容而只考慮誘殺蟲數與有效期間之長短，使得滅雄法往往無法得到預期之效果。特別是當田間果實蠅族群快速增加的時期，更需要利用誘殺速率較大的誘殺板予以誘殺。



圖十、利用燈式誘蟲器(虛線)與誘殺板(實線)之累積誘殺蟲數之增加趨勢。燈式誘蟲器之誘蟲效力三個月後減爲一半，六個月後全失。誘殺板之誘蟲效力二個月後減爲一半，四個月後全失。但使用相同之劑量，因此最後之劑量，因此最後之累積誘殺蟲數應相同。

Fig. 10. The comparison of number of accumulated captured male in the case lantern type trap (dotted line) and poisoned fiber board (stead line) are used for the male annihilaltion technique. The attractant efficacy of lantern type trap is imagined to decrease to halef after 3 months and entirelydisappeard till 6th month. Such of fiber board discrease to half after 2 month and disappear within 4 month. The shade area show the difference of No. of alive male used those techniques.

誘殺曲線之分析

在害蟲發生量之偵測中，誘殺法是吾人常用之方法之一。若不改變誘殺方法及效率時，誘殺蟲之增加表示害蟲發生量之增加，誘殺蟲之減少反映發生量之減少。但整個誘殺曲線之變化，不但表示該害蟲發生量之變遷，曲線之形狀更可以提供一些應變防治對策之訊息。以下即以東方果實蠅之誘殺曲線爲例敘述我個人之淺見。

利用含毒甲基丁香油對東方果實蠅雄性成蟲的誘殺曲線大致可分如圖十一之A、B、C、D、E、F六個類型。即；

A：誘殺曲線高居不下，表示所用的誘殺方法雖佳但誘殺壓力不夠，改變誘殺方法應增加誘蟲器設置數目。

B：誘殺曲線一直保持低水平，表示該地區之發生量少，可繼續現行之方法或減少使用量，甚至暫時可停止。但考慮雄蟲具多次交尾之習性，應繼續施予誘殺壓力，以維持現況爲上策。

C：開始時誘殺蟲數甚多，但短期內降低，然後保持低水平。表示該法效果甚佳，以後之應變方法大致與B相同。

D：開始時誘殺蟲數甚多，但短期內降低到某一程度，其後一直維持其水平不再下降。

E：誘殺蟲數雖然有下降趨勢，但下降速度緩慢。

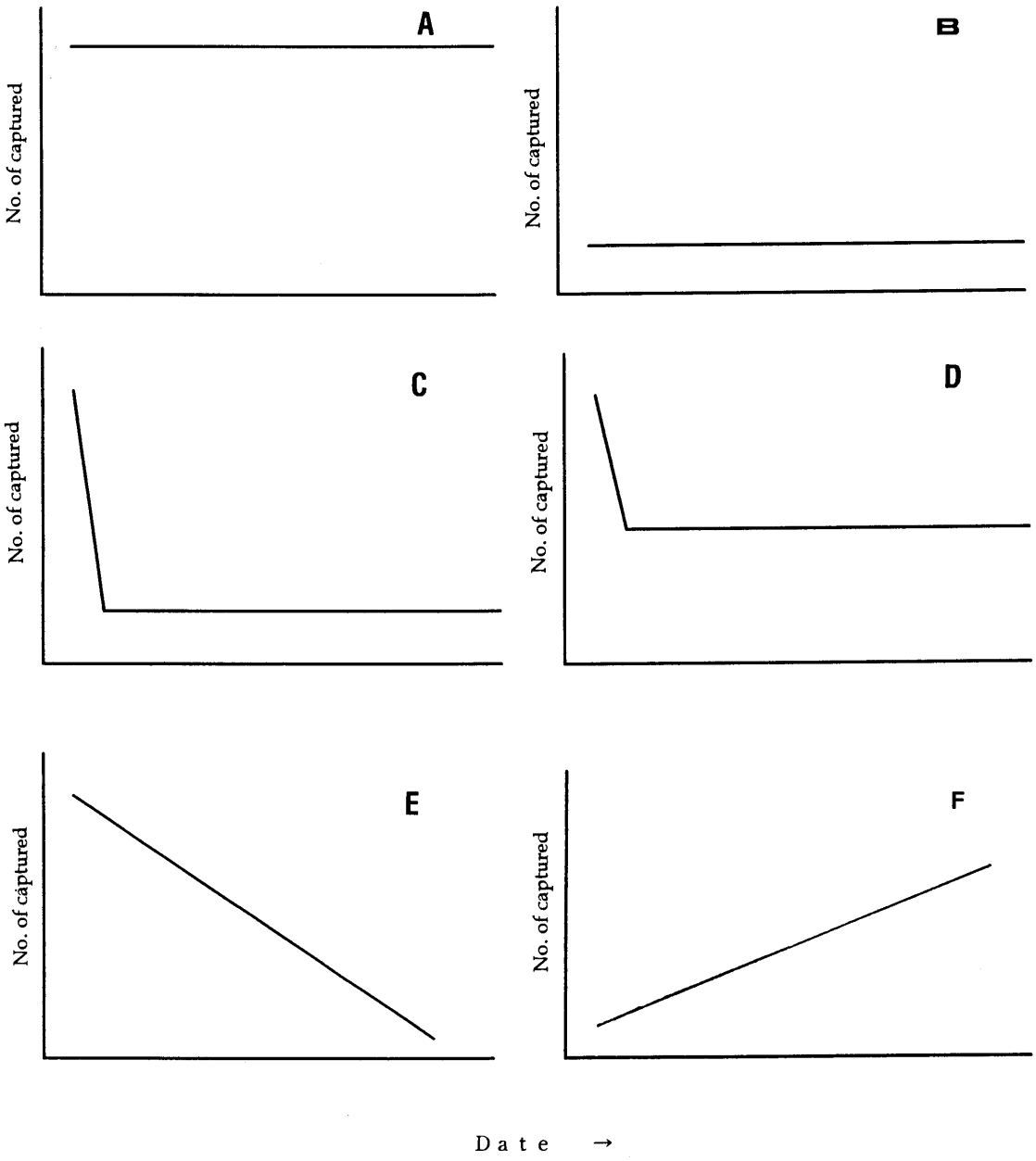
F：誘殺蟲愈來愈增加。

以上六種類型中較複雜的爲D、E之兩種。在此推測產生此種誘殺蟲數曲線之原因，但爲說明方便，各以圓圈表示雄蟲之密聚棲所（hot spot)及誘殺器材之有效範圍。但如第二項所述；有效範圍內之誘引效果隨與設置位置之距離增加而漸減。雄蟲之棲息密度也相同，在密聚棲所愈近中心點處之密度爲最高，愈離中心點密度愈降低。無論是誘引劑之誘引效果或是雄蟲密度，在所示的圓圈內並非均勻存在的，這是在誘殺曲線之分析上必須要留意的。

先就D的情形而言；極可能誘蟲器之設置位置極接近密聚棲所之中心點，即密聚棲所之中心部位在誘蟲器之有效範圍內。因此在誘蟲器設置初期馬上可誘致多數之雄蟲，但雄蟲之棲息範圍較廣，誘蟲器之有效範圍未能涵蓋整個棲息範圍。由於密聚棲所中心部之環境條件比其外緣部更適合東方果實蠅之棲息，在中心部之多數雄蟲被誘殺後，本來被迫聚於外緣部之雄蟲便向中心部遷入，然中心部又爲誘殺劑之有效範圍內，如此產生雄蟲陸續被誘殺(圖十二)。如果密聚棲所的範圍較窄，完全包括在有效範圍內即形成C之誘殺曲線(圖十三)。

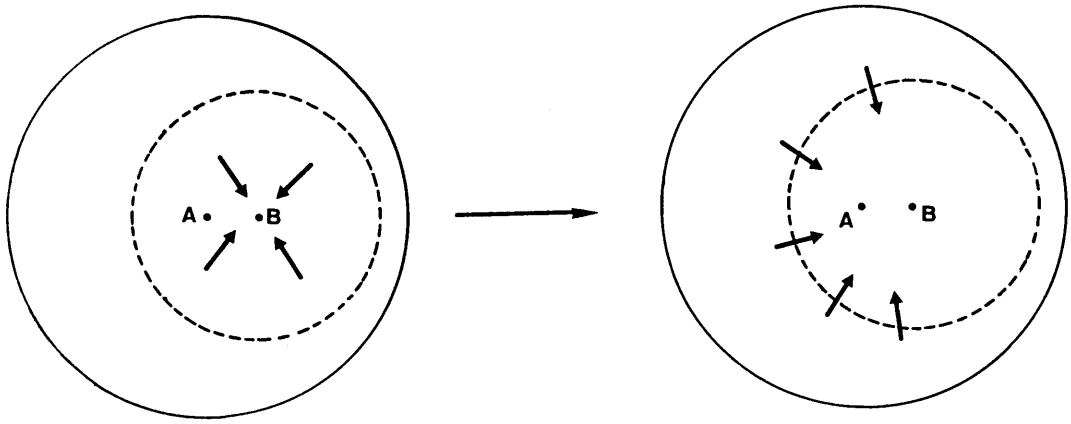
就E之曲線而言；可能會聯想到數種情形。第一爲有效範圍只涵蓋棲息範圍之一部分，而棲息中心點不在有效範圍內，此時誘蟲器之設置地點與中心點之距離較近時，曲線之形狀愈近D型。但無論如何，大部份的雄蟲仍在中心點，在此只能誘到自中心部分或有效範圍附近偶而飛進之雄蟲(圖十四)。如果誘蟲器之有效範圍涵蓋兩個以上之密聚棲所時也可能發生類似的現象(圖十五)。因此，若誘蟲數形成E形曲線時不能因誘蟲數之漸低而感到興奮，因爲此時誘引劑之有效範圍未能涵蓋多數雄蟲棲息之場所，即誘蟲數之減少只反映有效範圍內雄蟲之減少，並不代表整個雄蟲族群之減少。至於F的情形，表示新羽化或遷入雄蟲數超過誘蟲數，並在有效範圍內出現新的密聚棲所。以上說明爲了簡化內容幾未考慮在誘殺過程中新雄蟲之羽化，而密聚棲所的範圍也設定不變化。其實棲所範圍也隨族群之盛衰而改變，若是考慮此項或可做更正確之分析。由於目前尚無東方果實蠅雄蟲選擇何種場所爲它密聚棲所之有關資料，在D、E、F曲線下，只能以增設誘

殺板對付它，至於在何處增設及增誘多少量等具體之應變方法仍待日後之研究。



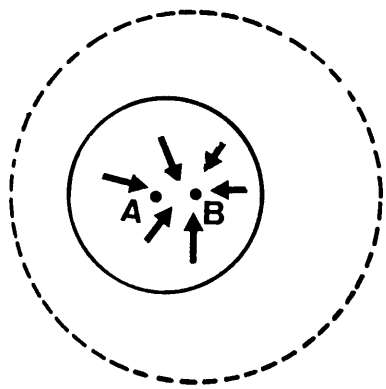
圖十一、以甲基丁香油誘殺東方果實蠅雄蟲時誘殺曲線之六大類型。

Fig. 11. Curves of number of captured male oriental fruit fly attracted by methyl eugenol.



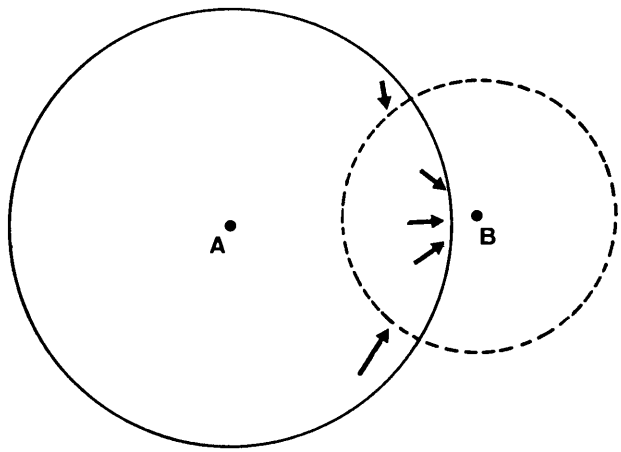
圖十二、雄蟲密聚棲所之中心在誘蟲劑之有效範圍內，但有效範圍未涵蓋整個棲所時之雄蟲移動方向。實線及虛線各表示雄蟲之棲息範圍及誘蟲劑之有效範圍 A：密聚棲所中心，B：誘蟲器之設置位置。

Fig. 12. The migrating movement of male fruit fly. In the case, the active range of the attractant cover the main area of hot spot, but not cover whole the hot spot. Stead and dotted line show the range of male hot spot and active range of A : center of hot spot, B : site of trap.



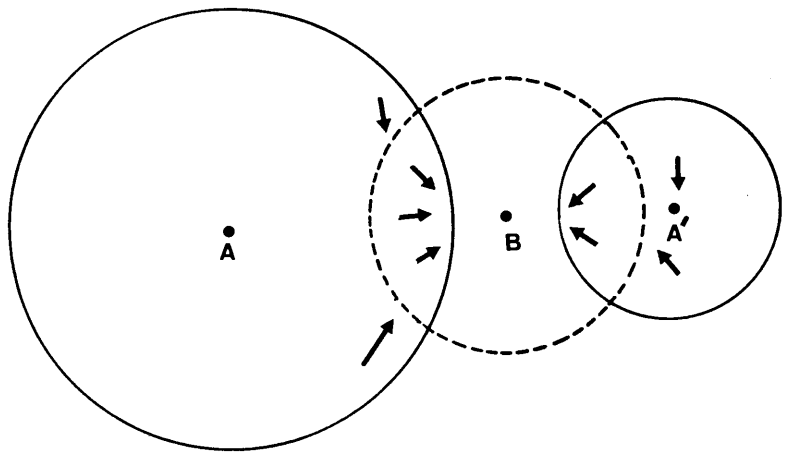
圖十三、雄蟲之棲息範圍完全被涵蓋在誘蟲劑之有效範圍時雄蟲移動方向。說明參考圖十二。

Fig. 13. The migrating movement of male fruit fly. In the case, the active range of the attractant covers whole the hot spot. Also refer note of Fig12.



圖十四、誘蟲器之有效範圍未涵藝雄蟲棲所中心部時之雄蟲移動方向。說明參考圖十二。

Fig. 14. The migrating movement of male fruit fly. In the case, hthe active range of attractant only cover a part of hot spot of male. Also refer note of Fig12.



圖十五、誘蟲器之有效範圍涵藝兩個雄蟲棲所之一部分時雄蟲移動方向。說明參考圖十二。

fig. 15. The migrating movement of male fruit fly. In the case, the active range of attractant cover a part of 2 hot spots of male. Also refer note of Fig12.

謝 辭

本文之撰寫承蒙農業試驗所應用動物系陳健忠博士多方指正及提供寶貴意見，特此致謝。

Some Consideration in Practical Use of Insect Attractants

Yau-I Chu

Department of Plant Pathology and Entomology, National Taiwan University

Abstract

Attractant is highly useful materials for the monitoring of insect occurrence or pest control. While in purpose to obtain the expected effect on the monitoring or control operation, through the application of the attractant several factors should be take into the consideration. In the present paper, special notes are made on the following 4 items : 1) No of trapped insects and percent trapped, 2) Active duration and range, 3) Velocity of the trapping action and 4) Analyses of the data in the trapped insect.

Although number of trapped insect can show the trends of abundance of target insect. The accurate efficacy of trapping should be indicated by the ratio between the number of trapped and untrapped insect. This is quite a same way that the effect of contact insecticide should be evaluated with the mortality of the treated insect. The activity of the attractant do not suddenly disappear after the certain duration or distance exceed. Usually the effectiveness of the attractant is gradually decrease as the duration or distance passed. This is extremely important consideration in the case the sex pheromone or attractant is used in mass trapping method. Also such conception is indispensable to dicide the trap grid in the field either the monitoring or pest control use. When the attractant is used for the male annihilation, velocity of trapping is another key factor to influence the final effect. As in this method, male insects should be trapped and killed before their mating. Therefore, the trap or dispenser with large evaporating surface which show big active range and high trapping velocity become the preferable material for this use. The survey on the population changes of pest insect is sometimes made by attractant. The data obtained is almost use for the analysis of the influence of the climatic factors on the population in the past studies. However if short-term scrutiny is conducted on the data, the result will afford some suggestion to study the dynamic situation of the habitat or hot spots of the target insect pest. Such work undoubtedly provide the available information for the inprovement of the further control operation of the pest insect.

Key words: attractant, attractiveness, percent attracted, active duration, active range, velocity of attracting, curve of attracted insect.

「植物保護新科技研討會」專刊
臺灣省農業試驗所特刊第57號 pp. 133-139 (1996)

茶蠶的性費洛蒙研究

周 延 鑫
中央研究院動物研究所

摘要：茶蠶(*Andraca bipunctata*)性費洛蒙的組成成分，經由氣相層析法分析其質譜圖，以及其DMDS衍生物之質譜圖後，鑑定出四個主要成分，即十八碳醛(18：Ald)，反-11-十八碳烯醛(E11-18：Ald)，反-14-十八碳烯醛(E14-18：Ald)，與反，反-11，14-十八碳二烯醛(E11，E14-18：Ald)。此四成分與合成品做比對，質譜圖和氣相層析滯留時間相同。每一雌蟲(1天到3天齡)性費洛蒙腺體含此四成分的量爲121±76，50±20，187±75，237±110ng，比例爲20：8：31：41。合成的反，反-11，14-十八碳二烯醛在田間試驗可以抓到雄蟲。其它三種則抓不到雄蟲。雄茶蠶觸角對反，反-11，14-十八碳二烯醛有劇烈的反應。另外，將去頭雌蟲體內注入PBAN(pheromone biosynthetic activating neuropeptide)之後，反，反-11，14-十八碳二烯醛的含量由原來正常雌蟲的55%，增加到75.5%。因此反，反-11，14-十八碳二烯醛是茶蠶的性費洛蒙。這是蠶蛾科(Bombycidae)中，第三個性費洛蒙被鑑定出來的蠶蛾。而反，反-11，14-十八碳二烯醛則是第一次被稱爲昆蟲的性費洛蒙。

關鑑詞：茶蠶、性費洛蒙。

前 言

生物要能在地球上成功的生存，認識週圍環境的組成，並盡可能的去利用一些環境中特殊的物理、化學及生物的因子是非常重要的事情。例如我們人類就常借重五種感覺，即視、聽、嗅、味及觸覺來認識我們的週遭環境。可是在比較低等的動物中，如昆蟲類，牠們的視、聽、觸覺都不甚發達，可是牠們仍能在此地球上生生不息，牠們又是如何和牠們的環境交換消息的呢？這就不得不要談談牠們特有的靈敏嗅覺與味覺，也就是我們一般所謂的化學感覺了。

談到靈敏的嗅覺，我們又得從可以產生嗅覺的微量化學物質—性費洛蒙開始談了，性費洛蒙是什麼？在定義上，它就是雌蛾在交配時期所釋放的一種外分泌物質，雌蛾用它來引誘雄蛾不遠千里飛來尋找雌性交配，以便繁殖後代。

研究昆蟲的人都知道，性費洛蒙第一個鑑定成功的科學家是德國人卜提南氏，當時他用的材料是家蠶*Bombyx mori* (L.)；第二個用野蠶 *B. mandarina* M. 做性費洛蒙試驗成功的則是日本人。他們也發現這兩種蠶蛾都是雌蛾利用尾端分泌主要的性費洛蒙(E,Z)-10,12-十六碳二烯醇來引誘雄蛾交尾。可是在臺灣也有屬於蠶蛾科(Bombycidae)的第三種茶蠶 *Andraca bipunctata* W.，牠們是不是也分泌性費洛蒙？牠的性費洛蒙又是什麼物質？這是一個有趣的研究課題，現將我們解決這個問題的方法與成果報導於後，有興趣做研究的同仁一定也可以從這裡發現一些參考價值的。

尋「糞」見蹤跡

茶蠶的幼蟲專門吃茶樹的葉子，所以是茶園的大害蟲之一（圖一），農民都想將牠殺死；但是因爲牠們的成蛾都隱藏在濃密的茶葉內，不易被發現，如果要找牠們，有經驗的人，都是在地上先看見牠們幼蟲所排放的糞便，再仔細地在附近茶樹上尋找，才能看見牠們的蹤跡。

如果我們要研究牠，首先就是將這種茶蠶的幼蟲採回實驗室，放在一個塑膠盒內，每天用新鮮茶葉餵牠，讓牠在室內生長，這樣牠的化蛹羽化就很容易觀察。由此也可以知道這種蛾類和蠶蛾一樣，牠的雌雄個體在外型不同，雄蛾的觸角比雌蛾大很多，而雌蛾腹部要比雄蛾大很多，同時在雌蛾尾部有一個性費洛蒙腺體（圖二），而雄蛾沒有。這個性費洛蒙腺體平常是隱藏在尾端的體內，唯有在雌蛾要交配時，牠才會伸出來分泌性費洛蒙，引誘雄蛾來交尾。因爲這種蛾和蠶蛾太相似了，所以牠們一定也會有性費洛蒙，問題是，牠們的性費洛蒙到底是什麼物質？在國際的文獻上還找不到。



圖一、茶蠶幼蟲專吃茶樹之葉

Fig. 1. Larvae of tea cluster caterpillar, *Andraca bipunctata* Walker eat the leave of tea plant away and aggregate on the branch.



●非發情(左)與發情(右)的雌蛾，尾端有性費洛蒙腺體。





●正在交配的雌雄蛾（雄蛾在右，雌蛾在左方

圖二、非發情(左)與發情(右)的雌蛾，尾端有性費洛蒙腺體。正在交配的雌雄蛾(雄蛾在右，雌蛾在左方)

Fig. 2. Photographs of non-calling (left) and calling (right) females, sex pheromone gland is at the abdomenial tip (arrow). Mating male and female (left one) moths were showing on the bottom figure.

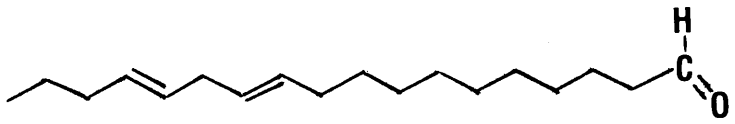
從三組試驗獲得至寶

首先我請本所的賀孝雍小姐，先將發情的雌蛾尾部剪下來，廿隻一組，分爲三組。第一組的尾端放在正己烷內，然後用氣相色層分析儀分析溶在正己烷內的化學成份是什麼？結果她發現其中有四個獨立成份，每個成份都和蠶蛾已知的性費洛蒙不同，所以是一種新的組成。

然後我們將第二組的尾端抽出物打入氣相色層質譜儀內，分別得到四種化合物的分子量，它們分別是268、266、266及264共四種。分子量268的物質經電腦查詢，認定它是飽和的十八碳醛，而266及264的物質應是比十八碳醛多一個雙鍵及兩個雙鍵的物質而已。

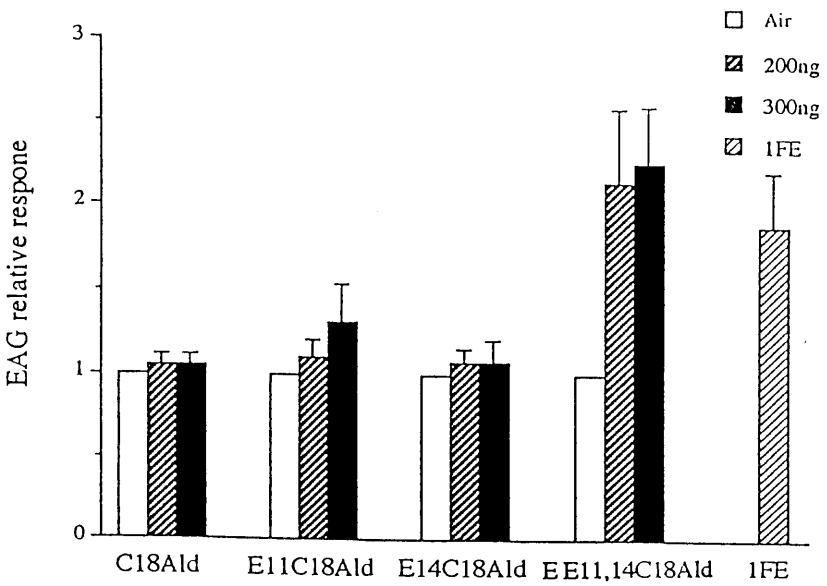
第三組的尾端抽出物使和化學物質DMDS(Dimethyldisulfide) 產生化學反應，由此反應衍生物的特性我們知道兩種分子量爲 266的物質，一是E,11-十八碳烯醛，另一是E,14-十八碳烯醛；而分子量爲264 的物質則爲(E,E)-11,14-十八碳二烯醛，其化學構造式見圖三。

因爲已經知道茶蠶的性費洛蒙是由(E,E)-11,14-十八碳二烯醛等四種化合物所組成，所以我們便請本院化學所的陶雨台博士，將此等物質以有機化學的方法分別的在試驗室內將它們合成了。



圖三、茶蠶性費洛蒙之化學構造，(E,E)-11, 14-十八碳二烯醛

Fig. 3. Chemical structure of the sex pheromone of tea cluster caterpillar, (E,E)-11, 14-octadecadienal.



圖四、雄性茶蠶對性費洛蒙之嗅覺反應圖

Fig. 4. EAG response of male *Andraca bipunctata* to 18:Ald, E11-18:Ald, E14-18:Ald, E11, E14-18:Ald, and 1 FE. The vertical bar indicates the standard error of the mean.

性費洛蒙生合成測量

性費洛蒙本來是雌蛾用來引誘雄蛾交配的訊息物質，所以在雌蛾不發情時，理論上牠不會分

泌這種物質。在蠶蛾的研究中，我們已經知道，性費洛蒙的合成與釋放，完全受腦(食道下神經球)內的細胞分泌的一種神經胜肽鏈(PBAN)來調控，這種胜肽鏈依照文獻是由33個胺基酸所組成，所以在試驗室內很容易用蛋白質合成儀將它合成。依照傳統的方法，我們在茶蠶雌蛾頭部與胸部處結紮，使位於腹部末端的費洛蒙腺體無法與神經胜肽鏈接觸，經過一段時間後，再用氣相色層分析儀分析其性費洛蒙的含量，果然發現性費洛蒙已不存在。如果再將這種結紮後的雌蛾腹部注射含有合成的神經胜肽鏈(5 pmol)後，經過一段時間讓它們作用，結果發現在性費洛蒙腺體，上面所說的四種成份都已恢復合成了，而特別是第四種成份(E,E)-11,14-十八碳二烯醛的量合成的最多，其比正常雌蛾的含量(240ng)都要高出二倍之多，可見它是茶蠶的主要性費洛蒙。

化學合成性費洛蒙之生物活性鑑定

有了有機化學合成的性費洛蒙純品，接下來的工作就是測量此等物質的生物活性，生物活性又分爲室內的嗅覺測量以及室外的田間誘蟲試驗。嗅覺測量就是將合成的化合物配成不同的濃度，然後用雄蛾的觸角去試，看看那一種化合物可以由最低濃度在觸角的感覺器上產生最大的電壓變化。茶蠶的嗅覺測試結果可由圖四表示，也就是說只有(E,E)-11,14-十八碳二烯醛可以在0.2微毫克的濃度下引起比空氣（對照組）增强一倍的電位差變化，而其它三種化合物則無此能力。最後我們進行田間試驗，分別將0.1 毫克的四種化合物單獨或是以不同的比例混合放在野外誘蟲，結果無論是在茶葉試驗所的茶園內，或是南港的茶園都只有(E,E)-11,14-十八碳二烯醛可以誘得雄蛾 (圖五及圖六)，所以這個研究結果是正確的。



圖五、合成性費洛蒙在茶園內誘蟲試驗

Fig. 5. Attraction traps of synthetic sex pheromone in the tea plantation.



圖六、用合成性費洛蒙所誘到的雄性茶蠶

Fig. 6. Capture of male moths by synthetic sex pheromone in the tea plantation.

結　　語

最後我要說的是，研究科學的方法並不困難，正所謂：「有樣學樣，無樣自己想。」，在這個茶蠶性費洛蒙的試驗裡，我們不但鑑定了第三種蠶蛾科－茶蠶的性費洛蒙，同時還是第一次在科技文獻內證明化合物(E,E)-11,14-十八碳二烯醛爲昆蟲的性費洛蒙，這個性費洛蒙以後不但可以大量在產茶國家如我國大陸、錫蘭與印度等茶園誘蟲，協助茶農滅雄，同時因爲茶蠶的幼蟲食量比茶捲葉蛾及茶姬捲葉蛾(目前在國內茶園已推廣防治的害蟲)的幼蟲大十倍以上，所以更有應用防蟲的價值。另一方面這也是一個本土的生物科研材料完全由國人在國內合作成功的例子，值得大家慶幸。

Isolation, Identification, and Synthesis of Sex Pheromone Components of Female Tea Cluster Caterpillar, *Andraca bipunctata* Walker (Lepidoptera : Bombycidae) in Taiwan

Yien-Shing Chow
Institute of Zoology, Academia Sinica

Abstract

Octadecanal (18:Ald), (E)-11-octadecenal (E11-18:Ald), (E)-14-octadecenal (E14-18:Ald) and (E,E)-11, 14-octadecadienal (E11, E14-18: Ald) were isolated and identified as major components from the pheromone glands of the tea cluster caterpillar, *Andraca bipunctata,* in Taiwan by analyzing the mass spectra of gland components and their DMDS adducts. GC retention times and mass spectra of the components were in agreement with those of authentic synthetic compounds. The average amount of 18:Ald, E11-18:Ald, E14-18:Ald and E11, E14-18: Ald per female gland (1 to 3 days old) was 121 ± 76, 50 ± 20, 187 ± 75, and 237 ± 110ng, respectively, in a ratio of 20:8:31:41. Synthetic E11,E14-18:Ald caught more males than each of the other three components or blank control in field trapping tests. E11, E14-18:Ald is reported as an insect sex pheromone for the first time. Male antenna responded to E11,E14-18:Ald strongly in an EAG analysis. Furthermore, 4 hr after the injection of PBAN (pheromone biosynthetic activating neuropeptide) into decapitated female moths (2 days old), the percentage of the E11,E14-C18 Ald in the gland extract increased from 0% to 75.5% , which was also significantly more than that of unligated and uninjected control at 55.1% . All these data indicated that E11, E14-18: Ald is the sex pheromone of the *Andraca bipunctata* in Taiwan.

Key words: *Andraca bipunctata,* sex pheromone.

「植物保護新科技研討會」專刊
臺灣省農業試驗所特刊第57號 pp. 141-150 (1996)

生物防治在作物病害管理上的應用與發展

羅 朝 村
臺灣省農業試驗所植物病理系

摘要：生物防治是一極具潛力的作物病害防治策略之一；亦是永續農業發展的重要一環。由整個生物防治的發展史來看，儘管生物防治在定義上有因個人解釋而略有不同，但在病害防治上，均可歸類成去病 (eradication) 或保護 (protection) 的基本理論；在策略上則可解釋成直接或間接利用微生物來降低作物病害程度 (incidence 或 severity)。依據整個植物病原生物防治的進展來看，顯示較具規模的應用與研究，有早期抑病土的發掘與利用；到後來的使用土壤添加物及單一微生物的利用...等。近年來，由於生物技術的引入，使得人們對生物防治機制、拮抗微生物或病原菌生態學上有了更深一層的瞭解，進而加速了拮抗微生物應用與發展。綜合目前生物防治已成功應用的例子，顯示一個成功的生物防治系統，基本上必須具備下列三個條件；(一) 有效的拮抗菌株 (二) 可大量生產的配方 (formulation) 與產品；(三) 可提供拮抗微生物在適當的環境下，維持活性 (viability) 及最低生長濃度的傳輸系統 (delivery system)。

關鍵詞：生物防治，病害管理，傳輸系統，分生標誌，微生物生態。

前 言

植物病害，爲作物產量損失的重要因子之一；根據 James 等的報告顯示世界主要作物，如：小麥、水稻、玉米、馬鈴署、蔬果及糖類作物等，每年總產量因病害而損失之平均值常高達12.5%以上[33]。因此如何提高產量或減少作物產量損失，以因應世界人口日漸增多[44]，而導致糧食缺乏的壓力，已成爲當今世界各國之農業發展的主要課題。

台灣地處熱帶與亞熱帶地區，氣候高溫多濕，因而作物病害種類繁[28]。例如土媒性病害的根腐病(*Fusarium* spp.、*Pythium* spp.、*Rhizoctonia* spp. 及 *Phytophthora* spp 等引起)、基腐病(*Rhizoctonia* spp. 及 *phytophthora* spp. 等引起) 與萎凋病 (*Fusarium* spp.、*Pseudomonas* spp. 引起) 等[4,28,29,31,32,45]；其它尚有線蟲病害，病毒病害及各種作物之葉部病害等[4,18]。

過去由於藥劑在使用上方便且快速有效，因而普遍爲農民所用[33]。然而在毫無節制的重複或過量使用化學藥劑，往往造成 (一) 病原菌抗藥菌系的產生，(二) 土壤及水源的污染，(三) 降低或減少有益微生物的存活，(四) 其它對人類及動物有害的負作用等[14,33]。因此如何尋求－無毒害性的人工合成化學藥劑替代品，實爲今後吾人應努力的目標。

生物防治是一極具潛力的作物病害防治策略之一；亦是永續農業發展的重要一環[11,33]。過去雖僅有少數商品化產品；但隨著對拮抗微生物特性的瞭解以及分生技術的引進如 (一) 分子標誌在拮抗微生物生態學上的利用 (二) 生物技術在拮抗菌株的改良 (三) 基因轉殖在生物防治機制的探討以及 (四) 作物抗病性的強化等；目前已陸續有多項生物製劑產品問市 (表一)[30,33]。因此，爲

能配合我農業科技發展的重點，以及解決作物栽培上病害的問題；本文將著重於論述生物防治的發展概況以及生物技術在其未來的應用範圍，以提供讀者之參考。

Table 1: Biological control agnets that are or have been commercially available

Control organism	Disease controlled
Viruses	
Mild tomato mosaic virus	Tomato mosaic
Mild citrus tristeza virus	Citrus tristeza
Mild papaya ringspot virus	Papaya ringspot
Bacteria	
Agrobacterium radiobacter K84	Crown gall
Pseudomonas fluorescens	Bacterial and fungal diseases of cereals, cotton and other crops
Streptomyces sp.	Fungus diseases of wheat, cucumber, carnation and crucifers
Fungi	
Trichoderma viride	Damping off, root diseases woody decays
T. harzianum	Damping off, root diseases of truf, beans, corn, cotton, cucumber
T. hamatum	
Fusarium oxysporium	Fusarium wilt
Peniophora gigantea	Annosus root rot
Pythium oligandrum	Damping-off
Paecilomyces lilacinus	Nematodes

Source: from Maloy S.C. (1993), and Lo, *et al.* (1994)

生物防治的定義

生物防治一詞早在1900即有植物病理學家引用，但仍未給予正式定義[7]。直到1963以後。Garrett[16]才給了正式定義；即凡是任何措施使任何的生物體(人類本身除外)至使病原菌的存活或活性降低，因而導至病原菌所引起之病害減少的狀況皆稱爲生物防治法。但此說明並未包括輪作，肥料施用或任何作物强化的調整。1974年Baker與Cook[7]之定義則較爲廣泛；即運用自然的或人爲的操作調整環境，寄主植物或拮抗微生物促進一種或一種以上微生物的活性，或大量導

入一種或一種以上拮抗微生物，使存在於寄生或休眠的病原之接種密度 (inoculum density) 或致病能力降低的方法。因此由整個生物防治的發展來看，儘管在定義上，因個人解釋而略有不同，但在病害防治上，則可歸類成去病 (eradication) 或保護 (protection) 的基本理論；在策略上則可解釋成直接或間接利用微生物來降低作物病害程度 (incidence 或 severity)[33]。

生物防治的演進與應用方向

對廣義的生物防治定義而言，生物防治的起源，在文獻上可朔至西元384－322的亞里士多德 (Aristotle) 時期[7]。即當時亞氏曾推薦生物性的方法 (biological method) 如作物輪作等。然而從微生物的角度來看；生物防治的發展與應用，則肇於 1874 年 W. Roberts 對微生物間有相互作用關係的發現，並引入拮抗作用 (antagonism) 一詞進入微生物學中[6,12]。爾後則陸續有微生物的代謝物或抗生素產生的報告，進而刺激了植物病原拮抗微生物的研究。另外如誘捕線蟲之作物；直接引入多種微生物防治作物病害以及抑病土 (suppressive soil) 等均有相當多的研究與發展。惟此－早期的發展並未形成統一化 (unified) 與組織化 (organized) 的生物防治知識 (biocontrol knowledge)；直至 1965 亦即 Carson 「寂靜的春天」出版後，生物防治才正式成立各種生物防治組織或探討各種特殊拮抗微生物的發展功能；並定期召開各種研究成果與未來研究方向的研討會[6,12]。綜合各方研究資料顯示與微生物有關的生物防治，其在植物病害上的應用與發展方向，約略可分成 (一) 抑病土的探討、(二) 有機物的添加及、(三) 微生物的直接引入等幾個主要方向。由於這方面的相關資料，已有多個專題報告過[3,6,7,8,10,19,24]，因此在此一節僅簡單敘述其關連性與應用策略。

抑病土的探討：大致而言，抑病土的存在，除少數例外，大都與原已存在的土壤微生物有關[7,26]。因此其研究與應用的主要方向，則在於如何提高原有的有效微生物或應用抑病土來保護作物，進而達到降低病害的效果。

有機物的添加：根據 Odum 之理論「凡生態體系 (ecosystem) 中任一微生物或族群之出現或持續存在，所必須仰賴的是其養份需求與對環境因子的忍受性 (tolerence)」[5]。因此適當的使用有機添加物，將可增加土壤中原有的微生物或人為引入之拮抗微生物；進而強化該微生物之抑菌功能或強壯作物本身的抗病能力等來減少作物病害的發生。惟添加物的使用，必須注意整個生態體系，如作物病原菌、拮抗微生物及其他微生物間的相互影響，以避免負面作用之產生[9,30]。

拮抗微生物的直接引入：Hartley 是首位直接引入多種微生物至土中來防治林木苗床病害者[7,12]。其後儘管有很多對自然界中生物防治發生原因的研究，但對單一拮抗微生物之引入，以為作物病害防治的趨勢，則起始於1980年代[6]。至於如何引用單一拮抗微生物或多種拮抗微生物來防治作物病害，則需要對整個作物，病原菌及拮抗微生物生態的釐清。

有效生物防治必備的條件

一個成功的生物防治，必須具備下列三個條件：(一) 首先是需擁有優良有效的菌株 (superior strain)，至於菌株的獲得則可利用篩選(selection)，原生質融合 (protoplast fusion) 或基因轉殖 (gene manipulation) 等方法[19,20]。(二) 可大量生產 (biomass) 並擁有長時間在室溫存活的能力即所謂的架上存活時間 (shelf life)。生物製劑的產生，必須要在價格上能夠與化學藥劑競爭，因此必須儘量開發較為便宜的材料與縮短醱酵時間；而其產品必須能擁有在室溫下耐儲存，耐乾燥…

…等特性。(三) 擁有一套傳送體系 (delivery system) 亦即建立一套能使此一微生物擁有－最低有效的基本生物量及最高活性的生物族群體[11,24,33]。以 *Trichoderma harzianum* KRL-AG2, or Bio-Trek 22-G (TGT.,) (Geneva,) (NY,) (USA) 商品爲例。此一菌株是經由原生質融合而得的菌株，具有抑制腐敗病菌(*Pythium* spp.)、立枯絲核菌 (*Rhizoctonia* spp.)、鐮胞菌(*Fusarium* spp.) 白絹病菌 (*Sclerotium* spp.)、菌核病菌 (*Sclertinia* spp.) 等所引起的病害[20,21,30]。在特殊醱酵配方下培養，可獲得高達每克土壤中含5×10^8 的分生胞子 (conidia)；並擁有達八個月以上的架上存活能力[24]。至於施用方法則依作物生態而略有不同；例如玉米田的施用，則必須依靠種植麥草 (ryegrass) 來維持此一菌株在無玉米作物下的存活並作爲下一季之接種源。

生物技術在生物防治上的應用實例及潛能

以往在植物病害防治的研究中，因傳統技術對於生物防治機制，不易了解與突破，但近年來由於遺傳工程技術的發展，已有部分因藉由基因操作而得到解決[28,39]。且由於利用基因轉移技術來證明生物防治機制，已較傳統的相關性推測精確，故目前已被廣泛利用[3,28]。目前在生物防治機制研究主要有抗生、競生及超寄生等三方面。

抗生作用的研究

在抗生作用的研究主要證明抗生素與抑病效果的關係。方式有二：一爲生化方法直接純化抗生素來使用，但常因不易從土壤中粹取到抗生素，或因粹取之抗生素量太低或未能施用於感染點，而無法獲得好的結果。二爲利用基因分析技術，此技術可解決上述問題。應用步驟如下：(a)會產生抗生素拮抗微生物應該會抑制病原菌或降低病害發展，(b)若將會產生抗生素的基因去除而獲得不產生抗生素的變異菌株，則其將喪失或降低對病害或病原之抑制能力，(c)當具有產生抗生素基因導入變異菌株後，應可恢復其抑制能力，(d)依同樣原理亦可應用病原菌的測定（如產生對抗生素不敏感菌株等）。由於若獲得正相關則表示生物防治之效用與抗生素有關。反之則無關。最明顯的例子：

(A) Agrocin 84：它是由*Agrobacterium radiobacter* K84 菌株 (帶有PAG84 plasmid) 所產生，可抑制 *A. tumefaciens* (帶有 Ti- plasmid) 引起雙子葉植物之腫瘤病 (crown gall)。證明方式爲 (i) 當傳送 PAG84 進入細胞內，即可產生 agrocin 84 而有抑制能力。反之若去除 PAG84 則失去產生 agrocin 84 的能力進而降低它的生物防治能力 (ii) 當 *A. tumefaciens* 之菌株對 Agrocin 84 有抗性時，K84 菌株即不能抑制病原之感染（iii）當直接以部份純化 agrocin 84 處理於傷口可完全抑制 *A. tumefaeiens* 爲害[35]。另外由於基因轉移技術的利用又證明 agrocin 84 雖然在防治上是重要的，但並不是有效防治的唯一機制[19,37]。如 Coodsey & Moore 顯示帶有已修復 PAG 84 的菌株僅能防治病害達 40～50％[13]。Schroth and Moller則認爲 K84 菌株之所以有效，尙與 *A. tumefaciens* 競爭感染點及營養有關[41]。

(B) *Pseudomonas fluorescens* strain 2－27 與 *Gaeumannomyces graminis* 之間的關係。此 2－27 菌株抑制小麥根腐病的主要機制有二，除產生 siderophore 外，另一機制爲抗生素。在抗生方面，則以利用Tn5 變異菌株 (不產生 phenazine 抗生物質者) 證明，抗生素與病害抑制不完全有關。Poplawasky *et al*[40] 發現當 Tn5 基因殖入變異菌株內 (Ill strain)，會增强抗生素量的產生，而其濃度大小與抑制病原菌生長效果成正比。

(C) *Pseudomonas fluorescens* strain Hv37a 抑制 *Pythium ultimum* 引起的棉花猝倒病。James and Gutterson 曾報告 Hv37a 可產生至少 3種抗生素去抑制生 *P. ultimum* 長[23]。Gutterson et al (1986) 曾引入一種 cosmid clone bank 到不產生抗生素之變異菌株中去篩選抗生素活性被阻礙的菌株。這一cosmid clones 可被一種 transposon 誘變而這transposon再被引入野生型菌株中，以作爲改變的標誌 (maker exchage)，再經過thin layer chromatography 培養測定，證實無生長抑制與降低病害能力之變異菌後，經纏化於根，仍然發現有抑病能力[17]。顯示變異株可和病原競爭養份或感染點而抑制病害，根據利用變異菌株之結果顯示在此一病害防治的機制是超過一種以上的。

營養競爭的研究

利用競爭能力强的微生物，主要在於減少可利用之特殊物質 (如鐵，氮，碳，氧或其他適宜病原生長的微量元素) 而限制病原菌之生長、發芽或代謝。由於營養競爭很難以變異菌株證明，且添加物質可改變病害的發生，亦不能有結論性的證據顯示防治的機制是與競爭養份有關[39]。因此目前有顯著證明者僅在鐵離子的競爭而這又與能產生siderophores 的微生物有關。

土壤微生物所產生的 siderophores 曾被證明與抑制鐮胞菌的厚膜孢子發芽及發芽管伸長有關[39]，例如對 *F. oxysporum* f. sp. *lini* 或 *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* 的導病土，可因加入 B10 菌株 (可產生 siderophores) 或 pseudobactin (siderophores 的一種) 而變成抑病土[25]。這顯示土壤的抑病作用部份是由於病原菌與土壤微生物競爭 Fe^{+3} 之結果。Bakker *et al* 曾利用 transposon element 誘變 *Pseudomonas putida* 去產生 siderophores 的變異菌株 (sid^-)，發現當其與野生菌株混合處理於土壤中，其菌落增加量較單獨處理於土中者多，而從 *Ps. fluorescens* 病原獲得的sid- 之菌株與 *Ps. putida* 的 sid^- 之菌株與 *Ps. putida* 野生菌株混合則其族群量顯著的降低[9]。此一結果被進一步證明顯示，來自 *Ps. putida* 的 sid- 變異株會利用 *Ps. fluorescens* 的產生的 siderophores，反之則不能[10]。

透過分析不但有助於營養競爭作用機制的了解，且可將之直接應用於農業栽培上。例如利用基因生物合成一種不平常的 siderophores (不爲有害菌所利用者)，則可適當的引入存活在一特殊寄主根圈的細菌，或利用基因轉移 (genetic manipulation) 去改變拮抗微生物的外蛋白質細胞膜，而能廣泛的利用土壤中微生物分泌的siderophores[19,27]。

超寄生作用研究

超寄生作用的研究，雖有很多例子，但已經利用在植物病原之生物防治則甚少[3,38]。然而有關超寄生微生物的寄生過程(如attraction, reconition等)則有助於未來生化或遺傳上的研究[18,38]。至於有關基因操作的應用，則有Howell 證明 *Gliocladium virens* 的超寄生是否與 *Rhizoctionia solani* 引起的棉花猝倒病有關[22] (因爲 *G. virens* 除可寄生病原菌之菌核外，尚與抗生素 viridin 和 gliotoxin 有關)，經利用無寄生作用，但會產生抗生素的變異菌株，發現其除生長較慢外，仍與野生菌株具有同樣的防治效果。此說明了 *G. virens* 的超寄生作用不是生物防治的主要機制。而此一結果提供了變異菌株分析是研究生物防治的良好例子，以及證明依靠外在表現出來的相關性 (如抑制作用與寄生作用)，去推論生物防治機制是危險的[18]。

另外由於細胞融合技術 (protoplast fusion) 的開發，也提供了寄生眞菌在生物防治上的應用，例如Stasz and Harman 報告 *T. harzianum* 在不同菌株之核融合中，篩選出的菌株，有些是較具有

防治*P. ultimum*的效果[42]。因此生物技術的應用不僅有助於生物防治機制的探討，而且可產生較有效的生物防治用之微生物[43]。

基因轉殖技術 (gene manipulation) 在防治上的應用

拮抗菌在田間常受環境因子影響而降低其防治的效果，使得其防治成本過高。基因轉殖技術主要爲選殖具有防治效應的基因或殘存能力較强的基因，然後轉移至作物或適合於存活在植物根圈內的微生物（或葉表微生物）來達到防治效果[19,38]。在美國於植物表面分離一種黃色細菌(*Erwinia herbicola*)，其中有些菌株會製造對梨火燒病(*Erwinia amylovora*)的抗菌物質，有些具有高纏化率(colonization)，利用基因轉殖技術將高纏化力基因轉移至會產生抗生物質的菌株中，而增强這些拮抗菌在田間的殘存能力和抗生能力[2]。目前雖然尚無轉殖菌株實際應用在作物病害防治者，但由於其在病害防治上的應用深具潛力，且鑑於在醫藥、發酵工業、細菌、病毒已有成功的例子，實值得吾人研究發展的目標。

結　　語

生物防治成功與否，由於牽涉到病原菌、拮抗微生物、寄主及環境條件等多項因子的相互作用，因此它的應用與施行首應具備管理病原菌病害所須有的知識，尤其應先透晰病原菌本身生物學與生態學的全貌，同時也得明瞭作物及拮抗微生物生態，才能確保生物防治的成功[1,16,34]。最近國外有關拮抗微生物應用於防治土壤病害、葉部病害或儲藏蔬果病害的研究甚多，尤其基因操作技術在生物防治機制或生態學上的探討，更有助於生物防治策略的擬定與突破。

近年來，生物防治的研究已較爲國人所重視，尤其在經費及人力上的投入已較往年爲多，惟如何在這既有的基礎下，繼續研究發展有效的生物製劑，以取代或減少化學藥劑在植物保護上的使用，實爲吾人今後應努力的目標。

參考文獻

1. 張和喜。1978。植物病害的生物防治。科學發展 2 (8) : 18-22。
2. 劉世東。1988。利用*Erwinia herbicola*當防治植物疾病的生物製劑。國科會生命科學研究推動中心專刊第十六集 p.169-176。
3. Adams, P. B. 1990. The patential of mycoparasites for biologlcal control of plant diseases. Ann. Rev. phytopathol. 28;59-72
4. Ann, P-J., Lo, C-T., and Hsieh, T-F. 1992. Phytophthora blight of *Lilium* spp. in Taiwan. Plant Prot. Bull. 34:64-69.
5. Atlas, R. M., and Bartha, R. 1993. Microbial Ecology:fundamentals and applications. 3th edition. The Benjamin/Commings publishing Company, Inc. Redwood City, CA.
6. Baker, K. F. 1987. Evolving concepts of Biological control of plant pathogens. Annu. Rev. phytopathol. 25:67-85.
7. Baker, K.F., and Cook, R.J. 1974. Biological Control of plant pathogens. t. Paul:Am. Phytopathol.

Soc. 433pp.

8. Baker, R. 1988. *Trichoderma* spp. as plant-growth stimulants. CRC Critical Reviews in Biotechnology. Vol. 7 :97-106.
9. Bakker, P. A. H. M., Lamers, J. G., Bakker, A. W.,Marrugg,J. D. Weisbeek, P. J., and Schippers, B. 1986. The role of siderophorcs in potato tuber yicld incrcase by *Pseudomonas putida* in a short rotation of popato. Neth. J. Pl. Path. 92 :249-256.
10. Bakker, A. W., and Schippers, B. 1987. Microbical cyanide production in their rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp. mediated plant growth-stimulation. Soil Biol. Biochem. 19: 451-457.
11. Cook, R. J. 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. Ann. Rev. Phytopathol. 31:53-80.
12. Cook, R. J., and Baker, K. F. 1983. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. American Phytopathological Society, St. Paul, MN. 539 pp.
13. Cooksey, D. A., and Moore, L. W. 1982. Biological control of crown gall with an agrocin mutant of *Agrobacterium radiobacter.* Phytopathology 72 :919-921.
14. Detweiler, A. R., Vargas, J. M.Jr., and Danneberger, T. K. 1983. Resistance of *Sclerotinia Homoeocarpa* to iprodione and benomyl. Plant Dis. 67:627-630
15. Fry, W. E. 1982. Principle of plant disease management. Academic Press, 378pp.
16. Garrett, S. D. 1970. Pathogenic Root-infecting Fungi. Cambridge Univ. Press. 293 pp.
17. Gutterson, N. I., Layton, T. J., Ziegle, J. S., and Warren, G.1986. Molecular cloning of genetic determinants for inhibition of fungal growth by fluorescent pseudomonad. J. Bacteriol. 165: 696-703.
18. Handelsman, J., and Parke, J. L. 1989. Mechanisms in biocontrol of soilborne plant pathogens, in : Plant -Microbe Interactions : Molecular and Genetic Perspectives, Vol.3 (T. Kosuge and E. W. Nester, eds.). pp.62-83, Macmillan, New York.
19. Harman, G. E., Hayes, C. K., and Lorito M. 1993. The genome of biocontrol fungi: Modification and genetic components for plant disease management strategies. American Chemical Society Chapman and Hall: 347-354.
20. Harman, G. E., and Nelson E. B. 1994. Mechanisms of protection of seed and seedlings by biological control treatments: Implications for practical disease control. In: T. Martin, ed, Seed Treatment-Progress and Prospects. British Crop Protection Council. PP283-292.
21. Harman, G. E., Taylor. A. G., and Stasz, T. E. 1989. Combining effective strains of *Trichoderma harzianum* and solid matrix priming to improve biological seed treatments. Plant Dis.73:631-637.
22. Howell, C. R. 1987. Relevance of mycoparasitism in the biological control of *Rhizoctonoa solani* by *Gliocladium virens.* Phytopathology 77 : 992-994.
23. James, D. W. JR., and Gutterson, N. I. 1986. Multiple antibiotics produced by Pseudomonas fluorescens HV37a and their differential regulation by glucose Appl. Environ. Microbiol. 52: 1183-1189.

24. Jin, X., Hayes, C. K., and Harman, G. E. 1991. Principles in the development of biological control systems employing *Trichoderma* species against soil-borne plant pathogenic fungi. Pages 174-195. in: Frontiers in Industrial Mycology. G. C., Leatham. ed. Chapman and Hall, Inc., Lodon.
25. Klopper, J.W., Leong, J., Teintze, M., and Schroth, M. N. 1980. *Pseudomonas* : a mechanism explaining disease suppressive soils . Current Microbiol. 4 : 317-320.
26. Ko, W. H. 1971. Biological control of seedling root rot of papaya caused by *phytophthora palmivora.* Phytopathology 61 : 780-782.
27. Leong, J. 1986. Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogen. Ann. Rev. Phytopathol. 24:187-209.
28. Lin, Y-S., and Lo, C-T. 1988. Control of Pythium daming off and root rot of cucumber with S-H mixture as soil amendment. Plant Prot. Bull. 30:223-234.
29. Liu, S. D. 1991. Biological control of adzuki-bean root rot disease caused by *Rhizoctonia solani.* Plant Prot. Bull. 33:63-71.
30. Lo, C-T., Nelson, E. B., and Harman, G. E. 1994. Biological control of *Pythium, Rhizoctionia,* and *Sclerotinia* incited diseases of turfgrass with *Trichoderma harzianum* 1295-22. (Abstr.). Phytopathology 84:1372
31. Lo, C-T., and Lin Y-S. 1989. Mechanisms of calcium cyanamide on controlling fusarium wilt of garden peas. Jour. Agric. Res. China 38(3):365-373
32. Lo, C-T., and Lin Y-S. 1992. Inhibition of *Pythium aphanidermatum* by volatile substances from soil amensed with S-H mixturre. Plant Pathology Bulletin 1: 206-209.
33. Maloy, O. C. 1993. Plant Disease Control: Principles and Practice. John Wiley & Sons, Inc., New York.
34. Mew, I-pin, C. 1975. Antagonism of soil-borne microorganisms. Plant Prot. Bull. 17 : 173-186.
35. Moore, L. W. 1988. Use of *Agrobacterium radiobacter* in agricultural ecosystems Microbiol. Sci. 5 : 92-95.
36. Moores, J. C., Magazin, M., Ditta, G. S., and Leong, J. 1984. Cloning of genes involved in the biosysthesis of pseudobactin, a high-affinity iron transport agent of a plant growth-promoting *Pseudomonas* stain. J. bacteeriol. 157: 111-115
37. Papavizas, G. C. 1985. *Trichodema* and *Gliocladium* : biology, and potential for biocontrol. Ann. Rev. Phytopathol. 23 :23-54.
38. Papavizas, G. C. 1987. Genetic manipulation to improve the effectiveness of biocontrol fungi for plant disease control, in : Innovative Approaches to Plant Diaease control (I. Chet, ed.), pp. 193-212, Wiley, New York.
39. Park, C. S., and Choi, J. S. 1983. Ecological relationship between soilborne plant pathogens and rhizosphere microorganisms. I. Effects of *Psedudomonas putida* on the suppression of microconidia and chlamydospore germiantion of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum.* J. Plant Protect. (Korean) 22(3): 186-192.
40. Poplawsky, A. R., Peng, Y. F., and Ellingboe, A. H. 1988. Bacterial Tn5 mutants affected in

antibiosis to *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici.* Phytopathology 78 : 426-432.

41. Schroth, M. N., and Moller, W. J. 1976. Crown gall controlled in the field with a nonpathogenic bacterium. Plant Dis. Rept. 60 : 275-278.

42. Stasz, T. E., and Harman, G. E. 1987. Improved biocontrol strains of *Trichoderma harzianum* developed by protoplast fusion. Phytopathology 77 :1771-

43. Stasz, T. E., Harman, G.E., and Weeden, N. F. 1988. Protoplast preparation and fusion in two biocontrol strains of *Trichoderma harzianum.* Mycologia 80 : 141-150.

44. The American Phytopathological Society. 1986. Long-range research goals for plant pathology. Phytopathology News 20(3) :105-116.

45. Wu, W. C. 1991. Control of sclerotinia rot of sunflower and chrysanthemum. Plant Prot. Bull. 33: 45-55.

Development and Application of Biological Control on Crop Disease Management

Cahur-Tsuen Lo

Department of plant pathology, Taiwan Agriculture Research Institute

Abstract

Biological control is an attractive alternative strategy for the control of crop diseases. It also provides practices compatible with the goal of a sustainable agricultural system. Despite the many definitions accorded biological control, it is a strategy for reducing disease incidence or severity by direct or indirect manipulation of microorganisms. The principle may be eradication of protection, depending on specific tactics involved in promoting biological control. According to evolving concepts of biological control of plant pathogens, there are three main categories including (1) suppressive soils, (2) organic amendments, and (3) introducing single microorganism in application and development of biological control of crop diseases. Recently, we have gotten more data of the mechanisms of biological control of plant pathogens and of ecology of pathogens and antagonists due to introduced biotechnology. These results lead us to the successful biological control of crop diseases. Taken most successful biological control cases together, the basic requirements of a successful system of biological control of plant diseases of other pests are (a) effective biocontrol agnets, (b) production and formulation methods that give rise to high yields of biomass consisting of appropriate efficacious

propagules of high viability and stability, and (c) delivery systems that provide a conducive milieu and minimize growth of competitive microflora.

Key words: biological control, crop disease management, delivery system, ecology of pathogen.

「植物保護新科技研討會」專刊
臺灣省農業試驗所特刊第57號 pp. 151-157 (1996)

農業廢棄物防治作物病害的展望

黃 振 文
國立中興大學植病系

摘要：稻稈、稻殼、花生殼、玉米穗軸、甘蔗渣、菜仔粕、篦麻粕、樹皮、廢棄菇類太空包培養基、畜禽糞便、蚵殼粉、血粉、魚粉與蝦蟹殼粉等農業廢棄物均蘊含有豐富的微生物與有機成分。將它們妥善的堆肥化(composting)處理，不但可降低環境污染的衝擊外，還可研製成優良的有機堆肥，成爲作物有機生產的原動力。此外，農業廢棄物可堆積製成種苗之抑菌(病)栽培介質，並可充作紓解殺草劑殘留量毒傷作物根系或防治作物病害的有機添加劑。其中研發本土化抑菌(病)介質時，發現採用七個香菇栽培農場之未堆積香菇太空包廢棄堆肥培育甘藍種苗，証明各農場的廢棄堆肥均呈現抑制種苗發育的現象；惟將該等廢棄堆肥添加硝酸銨與過磷酸鈣後，經過堆積零至十二星期，結果發現堆積的時間長短會顯著影響香菇太空包廢棄堆肥培育甘藍種苗的效果，其中尤以堆積十二星期的香菇太空廢棄堆肥最有利於甘藍種苗的發育。然而，不同堆積時間的香菇太空包廢棄堆肥卻均不具有抑制甘藍立枯病(*Rhizoctonia solani* AG-4)的效果。將腐熟香菇太空包廢棄堆肥與炭化稻殼按體積三對一的比率混合成SSC-05介質，然後各別添加0.1~0.5%(w/v)的骨粉、魚粉、牛血粉、菜仔粕或0.2~1.0%(w/v)的蝦蟹殼粉後，發現處理蝦蟹殼粉、牛血粉與菜仔粕一星期者，可顯著減少甘藍種苗感染立枯病菌的效果。至於研發有機添加劑時，發現在土壤添加1~5%(w/w)的金針菇太空包廢棄堆肥，可顯著保護豌豆根系免於拉草與丁基拉草的毒傷。若以香菇與金針菇太空包廢棄堆肥培育蔬菜種苗，証明這兩種堆肥可有效防治十字花科蔬菜根瘤病菌(*Plasmodiophora brassicae*)，西瓜根瘤線虫(*Meloidogyne incognita*)與西瓜蔓割病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*)等引起的病害。爲了研發農業廢棄物成爲多元化與合理化的作物病害防治製劑，因此將農業廢棄物與工業廢物、化學肥料及微生物等均勻配製成S-H, SF-21, GS與FB N-5A等合成土壤添加物(formulated soil amendments) 或在24~28℃，經過30~45天醱酵處理成CF-5與CH-100等合成有機添加劑(formulated organic adjuvants)。茲分別介紹各添加劑的組成分與功效如下: S-H混合物是由甘蔗渣、稻殼、蚵殼粉、尿素、矽酸爐渣與硝酸鉀等組合而成，可以在田間有效防治西瓜蔓割病、蘿蔔黃葉病(*F. oxysporum* f. sp. *raphani*) 、瓜類猝倒病(*Pythium aphanidermatum*)及甜椒白絹病(*Sclerotium rolfsii*) 等。SF-21混合物含有松樹皮、甘油、硫酸銨、氯化鈣、氯化鉀與硫酸鋁等，可以有效防治*R. solani, P. aphanidermatum*及*F. moniliforme* var. *subglutinans*三者引起之濕地松苗猝倒病。FBN-5A混合物是由魚粉、骨粉、血粉、菜仔粕、硝酸銨、香菇太空包廢棄堆肥與丙烯醇等均勻拌合而成，具有防治豌豆立枯病(*R. solani*)及萎凋病(*F. oxysporum* f. sp. *pisi*)的效果。此外，CF-5是FBN-5A混合物在水中醱酵30天的產物，它可防治甘藍立枯病外，還具有紓解草脫淨(50ppm)毒傷豌豆植株的效應。CH-100是S-H混合物、甘藍下位葉殘體、菸葉渣、氯化鈣與牛肉煎汁等經過醱酵45天後的濾液、再混合加入0.5%(v/v)酒精所製成的產物，具有促進西瓜、甜椒、甘藍等種苗的發育，提高梨、柑桔、葡萄與枇杷等果實的甜度與品質，並可防治梅黑星病(*Venturia carpophila*)，梅、李白粉病(*Podosphaeria tridactyla*)與韭菜銹病(*Puccinia allii*)等。顯然，妥善處理農業廢棄物不僅可以避免自然資源的浪費，提昇環境生態的品質外，而且還可有效防治作物病害，進而維護農業的永續經營。

關鍵詞：農業廢棄物、有機添加物、本土化介質、非農藥防治法、永續農業。

前 言

目前本省農作物栽培過程與農田生態環境，常出現下列幾項值得我們關注的問題：即(1)育苗介質攜帶或污染植物病原菌如 *Rhizoctonia* spp., *Pythium* spp.與 *Fusarium* spp.等，極易引起種苗猝倒病和立枯病的發生；(2)殘留農藥污染農田，直接或間接傷害輪作作物的根系，如拉草與丁基拉草的殘留量可導致稻田裡作或後作之豌豆根系的褐變壞死；(3)過度施用化學肥料，引起土壤酸化，降低農田的地力；(4)鉅量廢棄菇類太空包培養基堆置農田，造成環保隱憂；(5)土壤傳播性植物病原叢生，使得作物根部病害發生頻繁。因此筆者嘗試利用農業廢棄物研發本土化抑病(菌)栽培介質或防治作物病害的土壤有機添加物，藉以達成資源永續與降低農田污染的目標。

農業廢棄物的種類與用途

農業廢棄物有稻稈、稻殼、花生殼、玉米桿、玉米穗軸、甘蔗渣、菜仔粕、篦麻粕、樹皮、廢棄菇類太空包培養基、畜禽糞便、蚵殼粉、血粉、魚骨粉與蝦蟹殼粉等等。這些廢棄物經過堆積發酵後，可調製成堆肥或栽培介質。此外，農業廢棄物也具有防治植物病害的功效，例如：水稻田施用谷殼可以減輕水稻稻熱病與紋枯病的發生；金針菇太空包廢棄堆肥具有紓解丁基拉草與拉草毒傷豌豆根系的功效；香菇太空包廢棄堆肥可有效抑制番茄根腐病(*Pythium myriotylum*)的發生。因此，筆者與多位學者嘗試綜合利用各種農業廢棄物的特殊成分與優點，積極研發本土化的抑菌(病)介質，如SSC-06介質，及調製廣效性的土壤有機添加物，如S-H、SF-21、LT、CH-1、GS與CF-5等混合物(表一與表二)。這些合成介質與添加劑有的已正式商品化，亦有的尚在室內與溫室內進行防病效果評估中。

合成介質與添加物的研發步驟

抑菌(病)介質與添加物的研發步驟可歸納成下列五點：即(1)首先評估農業廢棄資材對作物生育、促進拮抗微生物與抑制作物病原的效應；(2)調製有效農業廢棄資材的協力組成百分比，藉以提昇防病的功效及降低施用量與成本；(3)在溫室與田間瞭解如何有效應用合成介質與添加物防治作物病害；(4)探討合成介質與添加物防治作物病害的理論基礎；(5)研究影響合成介質與添加物防治作物病害的因子。由於有些農業廢棄資材隱含有不利於作物生育的雜菌或植物病原菌或是存在有抑制作物生育的化學成分，因此在調配介質或添加物之前，應先將那些農業廢資材做適當的堆積與醱酵處理，才能使用。例如香菇太空包廢棄堆肥、金針菇太空包廢棄堆肥與靈芝太空包廢棄堆肥等，均應經過補充微量氮素或微量元素及調整水分含量達45～60%(w/w)後，經過一段時間的堆積與醱酵後，才能成爲合成介質與土壤添加物的資材。筆者曾經研究香菇太空包廢棄堆肥的堆積時間長短與其栽植之甘藍幼苗發育間的相關性，發現香菇太空包廢棄堆肥經過十二週的堆積之後，其培育之甘藍幼苗並不遜於或甚且優於生長在荷蘭泥炭苔者。顯然，農業廢棄資材對於作物生育的評估是研發優良介質與土壤添加物的首要步驟。

表一、七種防治土媒植物病原菌的添加物組成配方

Table 1. Ingredients of seven formulated products for control of soilborne plant pathogens[25]

Designation	Disease controlled	Ingredients	Reference
S-H mixture	Several diseases (see Table 2)	4 kg bagasse, 84 kg rice husks, 42.5 kg oyster shell powder, 82.5 kg urea, 10 kg potassium nitrate, 132 kg calcium superphosphate and 605 kg mineral ash.	30,23
SF-21 mixture	Damping-off of slash pine	150 kg aluminum sulfate, 25 kg potassium chloride, 30 kg calcium chloride, 10 kg triple superphosphate, 35 kg ammonium sulfate, 750 kg milled pine bark, and 750 L glycerine (10%).	27
LT mixture	Parasitic nematodes of citrus	40 kg shrimp/crab shell meal, 40 kg castor pomace, 10 kg marine algae powder, 5 kg soybean meal and 5 kg molasses.	2
AR-3 mixture	Southern blight of lily	35 kg cattle manure, 10 kg chaff, 10 kg crab shell meal, 5 kg urea, 3 kg calcium superphosphate, 1 kg potassium chloride and 36 kg mineral ash.	1
CH-1 mixture	Bacterial wilt of tomato	30 kg castor pomace, 20 kg crab meal, 10 kg bone meal, 36 kg mineral ash, 2 kg ammonium sulfate, 0.8 kg glycerol and 1.2 kg L-valine.	23
GS mixture	Pythium pod rot	4 kg gypsum, 15 kg rice husks,8.5kg sulfur, 7 kg oyster shell powder, 6.5 kg dry fish meal, 4 kg tobacco grounds and 5 kg complex fertilizer No.43.*	17,18
CF-5 liquid	Rhizoctonia blight of kale and peas	25 kg dry fish meal, 20 kg waste mushroom manure, 5 kg oyster shell powder, 1 kg sugar, 30 kg lime and 240 L water fermented at 24-28 C for 1 month and then mixed with 10% (v/v) allyl alcohol.	Huang & Yang (unpublished)

* Complex fertilizer No. 43 is a product of the Taiwan Fertilizer Company containing N,P,K, and Mg.

表二、在田間利用S-H混合物防治土媒蔬菜病害的效果

Table 2. Control of soilborne vegetable crop diseases by amendment of soil with S-H mixture in fields (Huang, 1991)

Crop	Disease name (pathogen)	Disease incidence (%)	
		Amended	Nonamended
Chinese cabbage	Clubroot (*Plasmodiophora brassicae*)	1.6 b*	46.0 a
Cucumber	Damping-off (*Pythium aphanidermatum*)	13.0 b	89.0 a
Watermelon	Wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*)	32.1 b	81.5 a
Radish	Wilt, yellows (*F. oxysporum* f. sp. *raphani*)	20.0 b	58.3 a
Pea	Wilt (*F. oxysporum* f. sp. *pisi*)	46.0 b	76.0 a
Pepper	Southern blight (*Sclerotium rolfsii*)	0.6 b	11.7 a
Bean	Rhizoctonia blight (*Rhizoctonia solani*)	1.2 b	14.5 a

* Means followed by different letters are significantly different ($P<0.05$). (Student's t-test).

介質與土壤添加物防治作物病害的原理

在介質與土壤中添加有機物或無機物，可以增強土壤微生物的活力與競爭作用，並誘使植物病原菌受害及促進作物生育。一般言之，在優良的介質與合成土壤添加物中，常含有兩種以上的有機物及無機物，因此它們防病與抑菌的原理常隨添加物與病原菌種類的不同而有所差異。筆者研發的SSC-06介質，是香菇太空包廢棄堆肥中添加牛血粉、蝦蟹殼粉、炭化稻殼與微量的生石灰組合而成，因此它防治甘藍苗立枯病菌(*Rhizoctonia solani* AG-4)的原因，在於介質內部微生物族群的更動外，牛血粉與蝦蟹殼粉兩種添加物可放出氨氣，具有毒傷或弱化 *R. solani* AG-4 生育的效果；此外，該介質內也隱含有不少未知成分的抑制物質，亦是抑菌的可能原因之一。往昔筆者研究S-H與SF-21兩種混合物的防病原理時，發現兩者抑菌的原因是下列數因子綜合表現的結果：

即(1)混合物內的無機鹽類可直接抑制病原菌，並可調整土壤的酸鹼值；(2)混合物可增加土壤中有益微生物的數量，進而抑制或瓦解病原菌；(3)混合物含豐富的營養及多種微量元素，可補充作物生長的需要，增加作物根系的發育。

結　　論

自然環境是一個有生命的有機體，它的健康與否關係著地球生命的永續，因此，從事農業經營的各階層人士與科學家們，均應體認農業永續對自然環境的重要性。尤其面對著農業廢棄物的污染問題及自然資源的流失，均不可等閒視之。爲了有效管制農業廢棄物，筆者僅提出下列四個淺見，希望對於農業資源的永續利用，具有棉薄的助益，即(1)妥善處理農業廢棄物可降低環境污染的沖擊；(2)農業廢棄物可研製成有機肥、抑菌(病)栽培介質與防治作物病害的有機添加物等；(3)調製農業廢棄物成爲介質與有機添加劑的參個基本原則：(a)產品可以培育健康種苗及農作物，(b) 產品具有抑制或殺滅植物病原的優良效果，(c)產品可以維護生態平衡，使環境污染的沖擊降至最小；(4)農業永續經營的過程務必重視各種農業廢棄物的特有成分與微生物資源的研發與利用。

參考文獻

1. 杜金池、謝廷芳、蔡武雄。1992。利用合成土壤添加物防治百合白絹病。中華農業研究 41 : 280-294。
2. 林奕耀、蔡東纂。1990。本省柑桔類線虫病害之發生及以有機添加物之防治。植保會刊 32 : 338 (摘要)。
3. 孫守恭。 1989。土壤添加物在病害防治之應用。有機農業研討會專集 141-155。台中區農改場編印。彰化。
4. 孫守恭、黃振文。1986。S-H土壤添加物的發展與運用。興大農業 1 : 6-9。
5. 黃振文、孫守恭、莊慶芳。1986。蘿蔔黃葉病綜合防治之研究。植保會刊28(1) : 80-91。
6. 黃振文。1991。利用土壤添加物防治作物之土壤傳播性病害。植保會刊 33 : 113-123。
7. 黃振文、孫守恭。1991。影響S-H混合物防治西瓜蔓割病的因子。植保會刊 33(3) : 231-238。
8. 黃振文、孫守恭、E. G. Kuhlman。 1992。研製土壤添加物防治作物土媒病害。農業資材對環境之影響研討會論文集 p83-116。台北。
9. 黃振文。1992。利用合成植物營養液綜合管理蔬菜種苗病蟲害。植保會刊34 : 54-63。
10. 黃振文、陳美杏、楊尙勳。1992。合成植物營養液對防治韭菜銹病的連鎖效應。植保會刊 34 : 257-265。
11. 黃振文。1992。發展有機添加劑培育健康而强壯的農作物。興農月刊 288 : 65-67。
12. 黃振文。1993。殺草劑對豌豆幼苗生長及其根部病原菌的影響。植保會刊 35 : 163-175。
13. 黃振文、黃錦河。1994。從土壤添加物管理作物病害的研究趨勢找到永續農業的務實訊息。農藥世界 126 : 27-31。
14. 黃振文、胡建國、曾德賜、黃錦河。1995。土壤添加金針菇太空包廢棄堆肥紓解拉草毒傷豌豆幼苗的效應。植病會刊 4: 76-82。

15. 黃振文、黃錦河。1995。殺草劑促進豌豆立枯病發生的機制。植保會刊37 : 107-116。
16. 黃振文、蔡東纂、高清文、孫守恭。1995。作物病害綜合管制之實例。植保會刊 37 : 15-27。
17. 陳世雄、黃振文。1992。土壤添加物防治大粒種落花生莢果黑斑病之研究。(I)對落花生罹病率及產量之影響。農林學報 41(2) : 77-83。
18. 陳世雄、黃振文。1992。土壤添加物防治大粒種落花生莢果黑斑病之研究。(II)石膏與其合成土壤添加物對落花生罹病率及產量之影響。農林學報 41(3/4) : 59-64。
19. 楊盛行。1995。廢棄物堆肥化微生物菌種之開發及應用。永續農業研究及推廣研討會專輯 P. 47-65。中華永續農業協會與台中區農改場編印。彰化。
20. 蕭芳蘭、黃振文、林俊義。1993。栽培介質對番茄萎凋病發生的影響。植保會刊 35 : 157-162。
21. 蕭芳蘭、黃振文、高清文。1994。番茄萎凋病抑病介質的抑菌特性。植保會刊 36 : 271-279。
22. 顏吉甫、陳昇明、楊策群。1983。穀殼利用之研究：水稻田施用穀殼的效益及抵抗病害之研究。中華農學會報新 124 : 19-30。
23. Chen, C. C., Hsu, S. T., Huang, J. W., and Tzeng, K. C. 1991. Effect of formulated soil amendment on root-colonizing ability of fluorescent Pseudomonads. Plant Prot. Bull. 33(4) : 421(abst.).
24. Cook, R. J., and Baker, K. F. 1983. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. The American Phytopathological Society, St. Paul. MN.
25. Huang, H. C. and Huang, J. W. 1993. Prospects for control of soilborne plant pathogens by soil amendment. Current Topics in Bot. Research Vol. 1 : 223-235.
26. Huang, J. W. 1994. Control of Chinese leek rust with a plant nutrient formulation. Plant Pathol. Bull. 3(1) : 9-17.
27. Huang, J. W. and Kuhlman, E. G. 1991. Formulation of a soil amendment to control damping-off of slash pine seedlings. Phytopathology 81 : 163-170.
28. Huang, J. W. and Kuhlman, E. G. 1991. Mechanisms for inhibiting damping-off pathogens of slash pine seedlings with a formulated soil amendment. Phytopathology 81 : 171-177.
29. Papavizas, G. C. 1975. Crop residues and amendments in relation to survival and control of root-infecting fungi ： An introduction. Page 76 *in* : G. W. Bruehl, ed. Biology and Control of Soilborne Plant Pathogens. The American Phytopathological Society, St. Paul. MN.
30. Sun, S. K. and Huang, J. W. 1983. Effect of soil amendments on Fusarium wilt of watermelon. Plant Prot. Bull. 25 : 127-137.
31. Sun, S. K. and Huang, J. W. 1985. Formulated soil amendment for controlling Fusarium wilt and other soilborne diseases. Plant Dis. 69 : 917-920.
32. Sun, S. K. and Huang, J. W. 1985. Mechanisms of control of Fusarium wilt disease by amendment of soil with S-H mixture. Plant Prot. Bull. 27 : 159-169.

Prospects for Use of Agricultural Wastes for Control of Crop Diseases

Jenn-Wen Huang
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University

Abstract

Agricultural wastes such as rice straw, rice hull, peanut husk, corn cob, bagasse, rape-seed pomace, castor seed pomace, tree bark, mushroom growth medium waste and shrimp shell powder are widely used in land reclamation and in production of horticultural crops. They benefit crop production by improving soil fertility, increasing soil organic matter and, in many instances, reducing the incidence of soilborne diseases. Several container media and organic adjuvants, e.g. SSC-06, S-H, SF -21, LT, AR-3, CH-1, GS and FBN-5A mixtures have been formulated by using agricultural wastes and fertilizers for the management of crop diseases in Taiwan. Most of the formulated products were designed to maximize the harmful effect on target pathogens and maintain soil fertility with minimal negative impacts on the agroecosystem. The mechanisms by which container media and soil amendments affect plant pathogens can be simple or complex depending on the amendments and the pathogen. In some cases, control is achieved by direct killing of the pathogen propagules, in other cases, disease suppression is the result of a combination of multiple factors, including direct poisoning of the pathogen and indirect effects by enhanced microbial activity and improved vigor of plants.

Key words: agricultural wastes, organic farming, sustainable agriculture.

「植物保護新科技研討會」專刊
臺灣省農業試驗所特刊第57號 p. 159 (1996)

雜草生物防治

蔣 慕 琰
臺灣省農業藥物毒物試驗所

摘要：傳統雜草生物防治多以引自境外之生物，防治外來雜草；此法以利用昆虫爲主，亦包括線蟲、菌類及較高等動物之應用。早自1830年代即用於仙人掌屬植物(*Opuntia vulgaris*)之防治。目前，全球已有三十餘科一百多種植物之研究記錄。針對仙人掌(*Opuntia* spp.)、*Hypericum perforatum*、*Chondrilla juncea*、*Salvinia molesta*、布袋蓮(*Eichhornia crassipes*)、豬草(*Ambrosia artemisiifolia*)之防治，均有成功之實例。生物性除草劑以利用眞菌爲主；1970年代初期，由美國開始發展，已知之研究涉及107種群(taxa)之眞菌及67種植物。達實用階段者，包括下列病原菌-植物之組合：*Alternaria cassiae* (CASST)-*Cassia obtusifolia*、*Cephalosporium diospyri-Diospyros virginiana*、*Colletotrichum cocodes* (Velgo)-*Abutilon theophrasti*、*Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* (Collego)-*Aeschynomene virginica*、*Colletotrichum goeosporiodes* f. sp. *clidemiae-Clidemia hirta*、*Colletotriehum goleosporiodes* f. sp. *cuscutae* (魯保一號)-*Cuscuta* spp.、*Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* (BioMal)-*Malva pusilla*、*Fusarium oxysporum* var. *orthoceras-Orobanche* spp.、*Phytophthora citrophthora* (DeVine)-*Morrenia odorata*。雜草生物防治研究及推展，一直以美、英、澳大利亞等國爲重心。近年東亞及東南亞各國，相關之研究日趨活躍；在臺灣，利用象鼻蟲(*Neochetina* spp.)防治水生雜草布袋蓮之計畫亦逐步展開。生物防治是雜草綜合管理(integrate weed management)不可缺少之一環，其發展及利用，可降低目前對合成殺草劑之過度依靠。對某些特定雜草或地區，生物防治較其它防治法，更具安全及經濟效益。

關鍵詞：雜草、生物防治。

「植物保護新科技研討會」專刊
臺灣省農業試驗所特刊第57號 pp. 161-180 (1996)

利用桿狀病毒防治作物害蟲

高 穗 生

臺灣省農業藥物毒物試驗所生物藥劑系

摘要：昆蟲病毒中之桿狀病毒由於對害蟲有致病力，致死力，有儲存性和對環境安全，最適於做爲害蟲防治劑。至於桿狀病毒在蟲害防治上之應用，最主要的方法在於將病毒製成殺蟲劑以噴灑方式使用，此外，尚有一些頗具前瞻性的防治法。包括：流行疫病的預測；古典生物防治；半古典生物防治；病毒資源管理；寄生性天敵和捕食性天敵之協助；自動傳染；病毒的早期引進；方格式引進。但由於病毒殺蟲時間長、寄生範圍窄、在環境中易受紫外線破壞、毒力低，使得發展受到限制。可借製劑配方和遺傳工程來改善其殺蟲性質。紫外線保護劑、增強因子和佐劑之添加有助於其在田間之表現。另外，利用基因重組技術：可在病毒基因組中插入對昆蟲有專一性的酶、激素或毒素的基因；病毒本身基因的修飾；異源病毒之重組等亦能改變病毒的殺蟲範圍和增加殺蟲效果。又，田間釋放經基因工程改造過之桿狀病毒之潛在風險和改善其生物安全性之策略亦於本文中討論。

關鍵詞：桿狀病毒、防治、害蟲。

前 言

桿狀病毒(Baculovirus)能造成包括鱗翅目、雙翅目、膜翅目及鞘翅目等之致命疾病[23]已有600餘種桿狀病毒被描述[42]。早期桿狀病毒科(Baculoviridae)被歸爲三個亞組(subgroup):A.核多角體病毒(nuclear polyhedrosis virus, NPV)，B.顆粒體病毒(Granulosis virus, GV)和C.無包涵體，桿狀核病毒(nonocluded, rod-shaped virus, NOV)[43]。而Francki *et al.*[21]將前二亞組歸類爲眞桿狀病毒亞科(Eubaculovirinae)，第三亞組歸類爲裸桿狀病毒亞科(Nudibaculovirinae)其中，NPV屬病毒又依囊膜(envelope)內含核衣殼(nucleocapsid)之多寡而區分成兩個亞屬：即單核衣殼核多角體病毒(single nuclecocapsid NPV, SNPV)，以家蠶核多角體病毒(*Bombyx mori* NPV)爲標準種；多核衣殼核多角體病毒(multiple nucleocapsid NPV, MNPV)，以加州苜蓿尺蠖蛾NPV(*Autographa californica* NPV)爲標準種。GV屬病毒則每一囊膜含一個核衣殼，顆粒體中含一個病毒粒子(viron)，少數含有兩個或兩個以上，以印度殼蛾GV (*Plodia interpunctella* GV)爲標準種。無包涵體桿狀病毒每一個囊膜含有一核衣殼，並無包涵體，以玉米穗蟲無包涵體病毒(*Heliothis zea* nonocluded virus, NOB)爲標準種。

當包涵體被昆蟲取食後，在中腸鹼性條件下溶解。被釋放的病毒粒子經過昆蟲腸道之圍食膜，感染中腸上皮細胞，特別是柱狀和再生細胞。病毒在這些細胞之細胞核中增殖，而後代核衣殼發芽穿過中腸細胞膜進入昆蟲血液中。此細胞外病毒(extracellular virus, ECV)，在血液中循環，再次感染昆蟲其他器官，如脂肪體。易言之，細胞與細胞間之感染和蔓延主要是細胞外病毒之作用。在感染後期，病毒粒子則被包涵體包住形成包涵病毒(occluded virus, OV)，主導蟲與蟲間之感染

(68)。桿狀病毒寄主範圍之特異性高，在自然界能造成流行病，降低昆蟲之棲群。故而，被認爲農林害蟲具吸引力的生物防治劑，是化學防治之替代方案。桿狀病毒在全世界曾經成功地被用來防治許多害蟲包括蘋果蛀心蟲，花旗松毒蛾，甜菜夜蛾，松小眼夜蛾，秋粘蟲，甘藍夜蛾等(67)。吾人可依據害蟲存活的策略，可以利用桿狀病毒來有效地防治害蟲。當然，面對桿狀病毒之限制因子，我們亦可借諸製劑改善和基因操作技術來提升其殺蟲特性。

以桿狀病毒來防治害蟲的策略

生態學者把某一生物在某一特定生態系中所賴以存活的策略區分成 r 及 K 兩種，由於策略的運用只是程度的差異，故事實上是由 r 端至K端的連續(r -K continum)(11,56)。根據這項理論，害蟲可分成 r 害蟲、K 害蟲及 r -K 中間物(r -K intermediate)， r 害蟲能適應高度不穩定的環境，它們的最佳策略是擁有極高的生殖能力，雜食性，體型小，具有遷移性，它們是一生態系中的墾荒者，一旦侵入棲所立足以後即能在短時內大量繁殖；相反的，K 害蟲一般生活在穩定環境中，其最佳策略是利用棲所之最大載荷量的剩餘空間，以低的生殖率及低的棲群密度，存在一低的平衡點上，一般個體較大，世代較長，較不易移動，其族群變動幅度小，常在一低的平衡點上，作小幅度的起伏(2,19)。如能瞭解害蟲在 r -K 連續所處的位置，和害蟲與病毒之關連性，就能適當的採用介入的策略，而能更有效地以病毒來防治害蟲(19)。

流行疫病預測

防治效果的好壞端在採行之策略，表一可見介入的策略，從被動開始，如果流行疫病能被預測的話，當然無需作任何防治，所以預測成爲介入最少的一種策略。由於流行疫病之預測是一個相當大的課題，本文之討論僅限於在已經存在的接種源情況下，降雨對起始猖獗族群感染率之影響，降雨主要被認爲是對昆蟲之眞菌流行病發展有利，但有許多資料顯示，對起動病毒之猖獗，亦有相當的價值。在熱帶或溫帶地區的夏季，有相當長的乾旱，故限制了接種源之移動。此時如果接種源已存在葉表，而沒有死亡的昆蟲保護，可能很快就被日光的紫外線不活化。在此情況下，流行疫病可能會被抑止，但在天然或人爲的降雨之後，會開始流行(19)。有學者提出針對毒蛾(*Lymantria ninayi*)在垂枝松之管理決策模式，根據前次毒蛾猖獗的密度和猖獗時間的長短，加上在孵化期和幼齡幼蟲期之降雨和乾燥，即可決定防治與否，因在某些情況下，降雨能造成病毒流行疫病盛行，故無需防治(19,55)。

古典生物防治

雖然許多昆蟲病毒能產生流行疫病，會嚴重地限制寄主的族群，但不能及時提供經濟的作物保護，或提供保護的期間有限，而不被歸於古典生物防治劑。然而雲杉鋸角葉蜂(*Gilpinia hercyniae*)被核多角體病毒所控制的歷史，則是一個相反的例子。在1938年偶然地引入此單一寄主的核多角體病毒，到一危害加拿大三萬平方公里雲杉林的雲杉鋸角葉蜂之族群中，造成大量的自然散佈，該害蟲亦受到控制。英國威爾斯地區在1970年至1973 年的雲杉鋸角葉蜂族群中，發生了核多角體病毒的流行疫病，之後，族群相當低(每10株少於 1 隻蟲)將來要利用病毒作古典防治劑時，只有在外來害蟲在新的地區建立族群，而不曾被受害區的天敵所控制之情況下，病毒才能顯現其價值(19)。

表一、病毒介入方式和寄主r-K選擇之關係[19]

Table 1. Routes of virus intervention in relation to host r-K selection

Route of intervention	Pest r strategy	r-K intermediate	K
Epizootic prediction	unlikely	valuable in plantation crops	unlikely
Classical biological control	unlikely	occasionally valuable	unlikely
Semi-classical biological control	unlikely	occasionally valuable	valuable
Virus resource mamagement	valuable in pasture and forage crops	valuable in pasture, forage and plantation crops	unlikely
Parasite and Predator support	possibly valuable	possible valuable	unlikely
Autodissemination	additive value	additive valuable	valuable
Early introductions	possibly valuable	possibly valuable	unlikely
Lattice introductions	unlikely	valuable	occasionally valuable
Sprays { Single	unlikely	valuable	sometimes valuable
Sprays { Multiple	often essential	occasionally necessary	sometimes essential

半古典生物防治

半古典生物防治是藉由天然的散佈機制來達到傳播病毒接種源的目的，但爲了要維持理想的害蟲防治限界，必需定期地提高接種源。三毛亞的犀角金龜(*Orycetes rhinoceros*)爲可可椰子之外來害蟲，在1967年開始釋放犀角金龜桿狀病毒之後，得到可接受的防治。過了 7 年之後，當感染水平下降到30-50%時，防治效果開始下降，在1975年再度釋放病毒後，無論是金龜之數目和損失，均有顯著的減少[40]。

病毒資源管理

有些例子看出害蟲和病毒間有著長期的平衡關係，並不會造成經濟損失，此種穩定是由於害蟲和病原共同享有對病原存活有利的環境，在紐西蘭的牧場，有蝙蝠蛾(*Wiseana* spp.)取食在土表或近土表的牧草，天然的核多角體病毒的流行疫病會發生，大多是病毒聚集於上層的土壤[34, 47]，若改變長期牧草爲短期牧草，並伴隨著犁耕，則造成蝙蝠蛾嚴重猖獗，其原因可能是由於接種源被埋到較深的土壤使然；此時再播種短期牧草，減少土壤的擾亂，病毒資源又再度恢復，經由這樣的管理系統，能得到良好蟲害防治及牧草之生產力[34]。

捕食性和寄生性天敵之協助

雖然捕食和寄生性天敵能被動但有效地攜帶昆蟲病毒，但對此能力很少有研究去瞭解和操縱。大多數的調查有關媒介桿狀病毒的寄生性天敵屬於小繭蜂類(表二)。在美北洲將姬蜂(*Lyphyroplectus oblongopunctatus*)之成蟲以核多角體病毒處理，釋放100隻於歐洲松葉蜂(*Neodiprion sertifer*)之二齡幼蟲族群中，能有效地建立該疾病[46]。

捕食天敵媒介病毒可經由其體表之攜帶，但重要的是有包涵的病毒，可經由捕食性天敵之腸道而存活，可能是由於捕食性天敵腸道的pH值爲中性到酸性之故(表三)，引入以核多角體病毒污染之捕食性椿象(*Podisus maculiventris*)於田間網室中，可使擬尺蠖(*Trichoplusia ni*)之族群，在21天內降到0，而僅有椿象之處理者，每株尚有14株擬尺蠖幼蟲[9]。

表二、能傳染桿狀病毒的寄生性昆蟲[17]

Table 2. Parasitoids transmitting baculovirus

Oder	Family	Nos. of species
Hymenoptera	Braconidae	7
	Encyrtidae	1
	Ichneumonidae	2
Diptera	Tachinidae	4

表三、桿狀病毒經動物腸道後仍具感染力[17]

Table 3. Survival of infectivity of bacuboviruses following passage through animal gut.

Class	Other	Numbers	
		Families	species
Insecta	Orthoptera	1	2
	Hemiptera	2	3
	Diptera	1	2
	Coleoptera	2	2
Arachnida	Opiliones (Phalangida)	1	1
Vertebrata	Aves	13	27
	Mammalia	7	9
Total		27	46

自動傳染

自動傳染疾病要能有效，應借重成蟲，因幼蟲期移動的範圍受到相當的限制(表四)。自動傳染最有名的例子是犀角金龜的防治，可可椰子的犀角金龜，在南太平洋地區是油棕和可可椰子最重要的害蟲。成蟲取食心葉和生長點，造成嚴重危害。犀角金龜之非包涵體桿狀病毒最早在馬來

西亞被發現[27]，此病毒能使幼蟲致命，亦會感染成蟲腸道[75]，造成細胞增殖且排出大量的病毒，使得罹病之成蟲變成一個活動的病毒工廠[28]，成蟲成爲媒介此疾病的病媒，可傳播此病一相當的距離[74]，另外，雌蟲產卵率亦大幅度下降[8]。

成蟲可在室內飼養，亦可在田間採集或誘集，餵以10 μ l病毒懸浮液於10％蔗糖水中，1隻成蟲腸道浸入10ml之10%糖水中，可感染1,000隻成蟲。成蟲保留一星期後，置於內置堆肥之開口盒中，任其自由進出傳播[19]。Young[74]指出於東加群島之Tongatapu 島，犀角金龜病毒在釋放後450日，可傳播30里外。故一旦建立起來，此病毒可以繼續在甲蟲族群中存在，成爲南太平洋地區防治此蟲最重要之方法[8]。

表四、成蟲自動傳染昆蟲病毒[19]

Table 4. Autodissemination of viruses by adult insects

Host	Virus	Method virus carriage
Oryctes rhinoceros	BV subgroup C	Infected adult gut
Neodiprion swainei	NPV	Infected adult gut
Trchoplusia ni	NPV	feeding NPV in sucrose
Hyphantria cunea	NPV	dusting
Heliothis spp.	NPV	dusting wild adults in/ off light traps
Colias philodice eurytheme	NPV	virus paste on female genital armature
Pieris brassicae	GV	

早期引進病毒

目的在於激發一自我維持的流行疫病，以免除一系列的噴灑，且能阻止作物在早期受害。此策略針對世代重疊或單化性而孵化期不一致 r-K 中間型的害蟲或 r 型的害蟲，有潛在的價值[19]。例如將甘藍在移植時，浸入核多角體懸浮液，在84天的取樣期間，能使95% 之擬尺蠖感病[33]。

方格式引進

決定以方格形式來引入病源，其引入的間隔是隨著引入點造成相當程度的感染所花費的時間，及傳播的距離而定，尙需將經濟列入考慮。此種方格式的引入，通常較普遍的噴灑要省錢，可以間隔噴灑或引入罹病之蛹隻來達成方格式引入[18]。

當作殺蟲劑使用

桿狀病毒適合做爲生物性殺蟲劑，噴灑桿狀病毒來防治害蟲成功的例子相當多。到目前爲止共有32種商品化之病毒殺蟲劑，但其中 Elcar已撤銷登記(表五)[14]。許多產品用於森林害蟲防治，且多爲政府單位登記者。森林爲使用病毒殺蟲劑最佳環境，因其生態系統相當穩定，經濟爲害限

表五、商品化之病毒殺蟲劑和其標的害蟲[14]

Table 5. Viral products which have been commercialised and their target pests

Viral Product	Producer	Status	Target pest(s)
1. *Adoxohyes orana* GV			
Capex	Andermatt Biocontrol, Switzerland	S	*A. orana*
2. *Agrotis segetum* GV			
Virin-OS	NPO Vector, Russia	R	*A. segetum*
Agrovir	- Denmark	RN	*A. segetum*
3. *Anticarsia gemmatalis* NPV			
Polygen	Agroggen S/A Biol Ag, Brazil	R	*A. gemmatalis*
Multigen		S	*Diatreae saccaralis*, *A. gemmatalis*
4. *Autographa californica* NPV			
VPN 80	Agricola El Sol, Guatemala	R	*A. californica*, *Trichoplusia ni*, *Bucculatrix thuberiella*, *Pseudoplusia includens*, *Estigmene acrea*, *Plutella xylostella*, *Spodoptera exigua*
5. *Cydia pomonella* GV			
Madex	Andermatt Biocontrol, Switzerland	R	*C. pomonella*
Granupom	Hoechst, Germany	R	*C. pomonella*
Carpovirusine	Calliope, France	S	*C. pomonella*
Decyde	MicroGeneSys,USA	S	*C. pomonella*
Virin-Gyap	NPO Vector, Russia	R	C. pomonella
6. *Heliothis armigera* NPV			
Virin KhS	NPO Vector, Russia	R	*Heliothis* spp.
78-3	- Mainland China	R	*Heliothis* spp.
7. *Heliothis zea* NPV			
Elcar	Sandoz, USA	W	*Heliothis* spp.
8. *Hyphantria cunea* NPV + GV			
Virin ABB	NPO Vector, Russia	R	*H. cunea*
9. *Lymantria dispar* NPV			
Gypcheck	USDA Forest Service	R*	*L. dispar*
Virin-ENSH	NPO Vector, Russia	R	*L. dispar*

Table 5. continued

Viral Product	Producer	Status	Target pest(s)
10. *Malacosoma neustria* NPV			
Virin KSh	NPO Vector, Russia	R	*M.neustria*
11. *Mamestra brassicae* NPV			
Mamestrin	Calliope, France	S	*M. brassicae, Heliothis* spp
Virin-EKS	NPO Vector, Russia	R	*Spodoptera* spp.
12. *Neodiprion sertifer* NPV			
Monisarmiovirus Kemira, Finland		R	*N. sertifer*
Virox	Oxford Virology, UK	R	*N. sertifer*
Preserve	MicroGeneSys,USA	S	*N. sertifer*
Neocheck-S	USDA Forest Service	R*	*N. sertifer*
Virin-Diprion	NPO Vector, Russia	R	*N. sertifer*
13. *Neodiprion lecontei* NPV			
Lecontvirus	Canadian Forestry Service	R*	*N. lecontei*
14. *Orgyia pseudotsugata* NPV			
TM Biocontrol-1USDA Forest Service		R*	*O. pseudotsugata*
Virtuss	Canadian Forestry Service	R	*O. pseudotsugata*
15. *Pieris rapae* GV			
PrGV(W1-78)	- Mainland China	R	*P. rapae*
16. *Plutella xylostella* GV			
PxGV	- Mainland China	R	*P. xylostella*
17. *Spodoptera exigua* NPV			
Spod-X	IPO-DLO, Netherlands	R	*S. exigua*
	Crop Genetics International, USA	R	*Spodoptera* spp.
18. *Spodoptera littoralis* NPV			
Spodopterin	Calliope, France	S	*S. littoralis*
19. *Spodoptera sunia* NPV			
VPN 82	Agricola El Sol, Guatemala	R	*S. sunia, S. exigua*
20. *Stilpnotia salicia* NPV			
Virin LS	NPO Vector, Russia	S	*S. salicis*

* Products produced and used by goverment agency and, therefore, not commercially available.

R = registered, S = pre-registration, RN = registration not requested, W = withdrawn.

界高，經常受到對森林有專一性的害蟲爲害。此外，主要幾個林產國家如加拿大和瑞典法令禁止於森林地區使用化學殺蟲劑。在此情況下蟲害防治有效且合法的方法，就是使用生物製劑諸如蘇力菌和病毒(12)。

森林害蟲如吉普賽舞蛾，天幕毛蟲(*Malacosoma neustria*)，歐洲松葉蜂，紅頭松葉蜂(*N. leconteí*)，花旗松毒蛾(*Orgyia pseudotsugata*)，雪毒蛾(*Stilpnotia salicis*)均能以其核多角體病毒殺蟲劑商品進行防治。蘋果蛀心蛾(*Cydia pomonella*)以其顆粒體病毒(CpGV)防治時，有良好效果，九年防治效果的比較，均有不俗的表現(表六)。

表六、在海德堡附近的一處試驗田連續九年以CpGV或傳統化學殺蟲劑處理蘋果蛀心蛾之防治效果比較(15)

Table 6. Efficacy of the codling moth granulosis virus (CpGV) during 9 years on an experimental field near Heidelberg in comparison to conventional chemical insecticide treatments

Year	% Reduction of codling moth damage	
	CpGV	insecticides
1974	76. 7	-
1975	78. 3	80. 5
1976	46. 0	39. 6
1977	76. 5	94. 8
1978	87. 0	99. 0
1979	90. 3	98. 5
1980	58. 1	80. 7
1981	58. 5	90. 1
1982	87. 0	99. 2

除了對蘋果蛀心蛾有良好效果外，由於其選擇性高，不傷天敵，天敵因而受到保育，從而避免爲了防治其他害蟲而使用化學藥劑。吾人可以從表六得知使用 CpGV 防治蘋果蛀心蛾要比使用固殺松(gusathion, MS) 對天敵的傷害少得多，因爲經CpGV處理的蘋果葉片上的歐洲葉蟎數目爲化學處理的百分之一，遠低經濟爲害限界，而化學藥劑處理的蘋果樹，其葉片受到嚴重的傷害，栽植蘋果的農民則不可避免地一定要加添使用殺蟎劑 (表七)。

目前CpGV共有三種產品已經註冊，另有兩種產品爲前註冊(pre-registration) 狀態，可以提供果農防治在蘋果，梨子和胡桃樹上蘋果蛀心蛾(12)。

1993年甘藍夜蛾核多角體病毒(*Mamestra brassicae*, NPV) Calliope公司以Mamestrin之商品名在法國註冊上市，用來防治甘藍上之甘藍夜蛾。尙可用來防治非洲地區棉花上之害蟲，亦可用於番茄上害蟲之防治。據稱該公司每天可生產三十萬頭幼蟲足夠生產處理一百公頃所需的病毒。每公頃施用 5 公升約相當於每公頃10^{13}PIB 之劑量。此產品在害蟲產卵期間，每 7 天需施用一次，因其對紫外線敏感，且對幼期之幼蟲有較高的活性之故。Calliope 之另一產品 Spodopterin 則是用

來防治在非洲地區棉花田已經產生抗藥性的海灰翅夜蛾(*Spodoptera littoralis*)。每公頃 4 公升的量約相當於每公頃10^{13}PIB 。而在歐洲則擬用於防治溫室中之*Spodoptera* sp.[12]。

表七、以CpGV或固殺松處理對蘋果葉片上歐洲葉蟎豐度之影響[15].

Table 7. Comparative effect of codling moth granulosis virus (CpGV) and Gusathion MS treatments on the abundance of red spider mites (Panonychus ulmi) on apple leaves

Sampling date	Treatment	Mites per leaf*
02. 08. 1982	CpGV	29
	Gusathion	3142
11. 08. 1982	CpGV	13
	Gusathion	2251

* Average number of eggs, larvae and adults

桿狀病毒殺蟲效果之改善

桿狀病毒由於殺蟲時間長，在田間安定性受到紫外線破壞，寄主範圍窄，不易於量產，而使其發展受到限制。除了可繼續自田間發掘毒力强、寄主範圍廣的病毒彌補上述缺失外，尚可經由基因工程改造、病毒增强因子之研究和製劑配方之改進，來改善桿狀病毒的殺蟲效果。

桿狀病毒之基因工程改造

1. 在桿狀病毒基因組中插入對昆蟲具特異性之荷爾蒙，酶，毒素或蛋白質基因構築桿狀病毒使其有較佳之殺蟲活性，首先要鑑定能防礙昆蟲代謝的基因爲何。可能的策略包括經由桿狀病毒重組體在昆蟲體內，過度表達調節利尿(利尿荷爾蒙, diuretic hormone) 或變態(prothoracicotropic hormone ；孵化荷爾蒙， eclosion hormone; allatostatin, allatotropin)之胜肽荷爾蒙，或者是過度生產酵毒(青春荷爾蒙酯酶； juvenile hormone esterase ；幾丁質酶，chitinase)。其他的侯選基因尚包括對昆蟲有特異性的毒素諸如蘇力菌(*Bacillus thuringiensis*)或蝎與蟎類的神經毒。這些基因的產物，當經由桿狀病毒載體以高水準表現時，干擾昆蟲的代謝，造成對昆蟲許多影響，其中包括了提早停止取食(見表八、九)。

表八、桿狀病毒經改造後生產具昆蟲特異性之荷爾蒙、酵素及蛋白質

Table 8. Engineered baculovirus producing insect-specific hormones, enzymes, proteins

Recombinant expressing	Intrinsic effect	Effect on insect	Reference
Diuretic hormone	water balance	20% reduction in LT50	39
Heliothis virescens juvenile hormone esterase	regulates molt	decrease weight gain	24
Manduca sexta eclosin hormone	eclosin	none	16
Maize mitoch protein URF13	male sterility in plants	toxic to insects	35

表九、桿狀病毒經改造後生產殺蟲毒素基因

Table 9. Engineered baculoviruses producing insecticidal toxin genes

Recombinant expressing	intrinsic effect	effect on insect	Reference
Butheus eupus toxin	paralysis	none	10
Androctonus australis toxin	paralysis	20% reduction in LT50,	57
		reduced feeding,reduced feeding and damage of leaves	7
Pyremotes tritici toxin	paralysis	toxic to insects	65
Btk δ -endotoxin	midgut paralysis	none	45
Bta cryIA (b)	midgut paralysis	none	41
Btm cryIVD	midgut paralysis	none	53

初期企圖改造病毒以增加毒並不成功。第一個攜有編碼蝎子(*Buthus eupeus*)毒素基因的病毒重組體，產生的毒素量並不能造成可偵測的生物活性[10]。蘇力菌毒素可在昆蟲細胞內和昆蟲上大量生產，且其對標的昆蟲之活性與細菌本身所生產的毒素活性相等[41,45]。但是在重組體內之細菌毒素在與野生型病毒相比較時，並不能增加其殺蟲活性。Pang *et al.*[53]將 cryIVD 基因導入AcNPV ，能產生殺蚊之原毒素，亦無改良效果。將利尿荷爾蒙基因[39]和來自菸草青蟲(*Heliothis virescens*)青春荷爾蒙酯酶[24]導入重組桿狀病毒中，在與對照病毒相比時，對寄主昆蟲之毒力，有些許增加，但插入孵化荷爾蒙基因[16]則無影響。

利用桿狀病毒重組體，將來自節肢動物阿爾及利亞蝎(*Androctonus austalis*)[57]和蟎(*Pyemotes tritici*)[65]之神經毒素基因，使其有所表現，則是最近的突破。此重組體分泌毒素進入蟲體，由於急速麻痺，可使寄主死亡之時間有顯著的減少。另外一個好處是取食爲害有相當程度的降低。龐義等亦將阿爾及利亞蝎之神經毒素基因，插入到擬尺蠖 NPV內，此株重組病毒可感染擬尺蠖，甜菜夜蛾，玉米穗蟲(*Heliothis armigera*)等害蟲，受感染之幼蟲，2-3天出現麻痺症狀，取食減少最後死亡，在保護植物葉片免受爲害方面效果顯著[7]。又，Wood *et al.*[69]及Hughes *et al.*[29]亦將蜘蛛毒素基因插入 AcMNPV之基因組內。最近玉米粒線體蛋白 URF13 的表現，在標的昆蟲上已經呈現殺蟲活性[35]。此項研究提醒我們要對表現異源蛋白的重組體重新評估。

2.異源病毒之重組擴大殺蟲範圍

斜紋夜盜 NPV(*Spodoptera litura* NPV, SLNPV)病毒粒子與甜菜夜蛾NPV(*S. exigua* NPV,

SeNPV) DNA BamHI 切片混合注射斜紋夜蛾幼蟲，一週後收獲病蟲血淋巴，接種 SE-1 細胞，細胞可被感染，且得到的重組病毒可在SE-1細胞上穩定傳代，取細胞增殖的多角體分別餵飼甜菜夜蛾幼蟲和斜紋夜盜幼蟲，幼蟲一週後死亡，呈現典型的多角體感染症狀。說明在SE-1細胞上篩選得到的是遺傳上穩定、寄主範圍擴大了的重組病毒。甜菜夜蛾NPV病毒粒子與斜紋夜蛾NPV DNA EcoRI 切片段超感染SE-1細胞，收集多角體餵飼斜紋夜盜幼蟲，一週後取病蟲血淋巴接種SE-1細胞，重複四次，每次在SE-1細胞上篩選到的病毒都能在SE-1細胞上穩定傳代，得到的多角體都能感染斜紋夜盜幼蟲，說明得到了寄主範圍擴大的、穩定的重組病毒[5]。

3.修飾病毒本身基因

苜蓿尺蠖蛾核多角體病毒 AcMNPV 含有一編號57kDa由 506個氨基酸組成之多肽 (即蛻皮素類固醇尿甘二磷酸—糖基轉移酶，ecdysteroid UDP-glucosyl-transferase)之egt 基因。egt 基因在AcMNPV感染蟲體後的表達可阻止幼蟲之蛻皮和化蛹，促進病毒自身的增殖。若刪除 egt 基因之後可顯著地改善病毒作爲殺蟲劑之特性，幼蟲經 egt刪除後之突變種感染後，比經野生型感染之幼蟲在取食量上有相當程度的減少，死亡亦提前[48,49]。若將 egt基因刪除，再插入阿爾及利亞蝎毒(AaIT)基因構築成vEGTDEL-AaIT AcNPV，在生體外測試，證實該重組病毒對鱗翅類細胞而言，是最有效的生物藥劑。其田間測試早已提出，但在美國環保署的審查仍懸而未決[54]。

病毒增強因子之研究

Lowe and Pascke [37,38] 證實 NPV和GV 之混合對擬尺蠖有累加作用。NPV-GV之混合對美國白蛾(*Hyphantria cunea*)和茶姬捲葉蛾(*Adoxophyes orana*)[20,31]亦有相似之結果。Tanada [60,61] 指出NPV和GV對一點粘蟲(*Pseudaletia unipuncta*)有協力關係(synergistic association)。另外，對其他鱗翅目的昆蟲如甜菜夜蛾，擬尺蠖，粘蟲(*P. separata*)及 *Xestia C-nigrum* 亦有相似的協力關係[13,22,32,58]。

Tanada and Hukuhara [62] 認爲GV之顆粒體的微小組成分，可能是種蛋白質，能增强 NPV的感染。此協力因子(synergistic factor, SyF)已從顆粒體以 gel filtration 和 hydroxylapatite column chromatography分離出來[25,63]。協力因子，再經證實爲是種脂蛋白 (lipoprotein) 其分子量爲98 kDa [36,72,76]，協力因子則位於蛋白基質之深處[73]，或爲GV的囊膜的一種組成分[76]，協力的相互作用發生位置在中腸且在病毒穿入血腔之前[62]。在協力因子存在時，附著於中腸細胞之病毒粒子(viron)的數目因而增加[64]，因協力因子對中腸細胞和病毒囊膜均具親和力[30,66,73]。協力因子亦增强 NPV在數種鱗翅目細胞系之生體外感染[50,51]，其原因可能由於增强發芽病毒之附著[52]或增進細胞膜和病毒囊膜融合之故[30,76]，另外，昆蟲痘病毒(entomopoxvirus, EPV)和 NPV亦有協力之相互作用。EPV 之球狀包涵體(spheroid)能夠增强NPV對粘蟲幼蟲的感染，此增强因子(enhancing factor, EF)爲分子量38kDa之醣蛋白[70,71]。

製劑配方之改進

商品化桿狀病毒的產品經調配後需能維持住其生物活性，其儲存壽命、配藥槽混合時之相容性、施用和覆蓋的特性均應獲得改善。通常之劑型爲可濕性粉劑，亦有懸浮劑，粉劑和粒劑者。製劑最重要的一個方向是產品的標準化。可在光學顯微鏡下計數得到數據。此方法相對地比較不可靠，因病毒數目並不能反應製劑生物活性。在病毒抽取前冷凍昆蟲可改善病毒的安定性，但儲

藏常造成效果的喪失。因此製劑本身的生物活性可做爲品質管制的方法。桿狀病毒通常十分具有活性，劑量在1 -5個包涵體即能造成昆蟲的死亡。然而，爲了要改善產品之成本效益，製劑配方能夠增進病毒在田間和儲藏期之安定性，就顯得十分重要了。可濕性粉劑通常較懸浮劑更有利於儲藏，因後者不易阻止微生物的生長。許多乾的製劑並不添加界面活性劑，因其降低病毒活性之故。在施用之前才加入界面活性佐劑。但 Sandoz 開發的噴霧乾燥製劑除外。保持產品活性的重要因子在於儲存產品時濕度低、無光照、pH保持中性(12)。

最近在吉普賽舞蛾 MNPV 製劑中添加光學或螢光亮劑，能使產品活性有明顯的增加。此類化合物原先是以紫外線保護劑的角色加入製劑中，但卻發現能增加數種病毒對寄主的毒力，在一實驗室的測試發現在加入1 % 之亮劑後，吉普賽舞蛾 NPV對四齡吉普賽舞蛾之LC50減少 400-1,000倍。但活性增加的原因未明(12)。另外，甜菜夜蛾 NPV在添加 Bivert, Agral90或Nu-film 等展著劑後具有增效作用。且經測試後發現尿酸，活性碳或黃嘌呤四種紫外線保護劑對甜菜夜蛾 NPV有較佳的保護效果(3,4)。而中筋麵粉對斜紋夜盜 NPV有較佳之紫外線保護效果(1)。

另外一個改善病毒活性的方法是與其他具生物活性的物質做配藥槽混合。添加蘇力菌或與低濃度化學殺蟲劑混合，均能使病毒有較佳的效果。使用化學殺蟲劑可能會使昆蟲衰弱，使其更易受病毒感染。其他方法尙包括利用取食刺激劑，誘使昆蟲取食大量的病毒。雖然能增加殺蟲效果，但時常造成在尙未防治前作物之損失，除了森林外，添加取食刺激劑被認爲接受程度不高。但是若種植陷阱作物，同時施用昆蟲誘引劑和經添加取食刺激劑之病毒製劑於其上，則能有效地防治標的害蟲又不會造成作物的損失，不失爲一個可行的方法，值得更進一步的探討與開發(12)。

構築具生物安全性之重組桿狀病毒

桿狀病毒在世界不同地區大規模地當成殺蟲劑使用的歷史已有半個世紀之久。其安全性有完整的紀錄可尋(59)，因其具有特異性使得在環境中施用時，就有先天的安全性。除了 AcMNPV 和芹菜夜蛾多核衣殼核多角體病毒(*Syngapha falcifera* multiple nuclear poly hedrosis Virus, SFaMNPV)外，大多數桿狀病毒僅感染單一或少數相關的昆蟲種類。其對非標的寄主包括脊椎動物、植物和有益無脊椎動物無不良作用，因此對環境無生態上之危險(ecological hazard)。但經遺傳工程改造後之病毒則需考慮其造成之風險。至於風險包括寄主範圍之錯列；經造改後之病毒自試驗點分散到其他生態系統去；病毒基因組之物理不安定性與其他生物交換基因訊息，特別是殺蟲基因之可能性等。最基本之疑問在於經遺傳工程改造後的桿狀病毒究竟在活動狀態上與野型病毒有何種程度的差異(67)。

利用遺傳工程改造桿狀病毒，目的在於增進其殺蟲活性，以利蟲防治。雖然可預期其無不良作用，但考慮到安全性，如果能使得經改造後之重組病毒，在環境持續性減短，不失爲一理想的手段。又如減少重組病毒之生物適應性亦爲良好的方案，有三種策略達到上述的目的。

第一個策略爲生產能維持毒力而有著減少生物適應性的病毒。依循著基因插入的策略，將基因從桿狀病毒中刪除。此種刪除能造成病毒持續性或後代病毒生產力的減少，因而使其流行疫病潛能受到極大的限制。可刪除的基因諸如 polyhedrin, p10, polyhedron envelope gene, egt,及chitinase等。(表十)(67)

若以殺蟲基因取代 polyhedrin 基因而成無包涵體 (OB-minus) 重組體，當與野生型桿狀病毒共

感染(co-infection)，可共同包涵(co-occlusion)於野生型桿狀病毒之包涵體內，因而可散佈到環境中去。當釋於到環境時，無包涵體之基因則有選擇性的劣勢，(迅速地被不活化)，故而僅具有包涵體者具感染性且有持續性。無包涵體之基因型逐漸從基因庫中消失。在美國Boyce Thmpson Institute of plant Research at cornell之 Dr. H. A.Wood，於1990起從事無包涵體病毒的田間釋放實驗。此刪除 Polyhedrin 之突變種重組體很快地自生態系統中消失(表十一)[67]。

表十、經基因刪除的突變種其生存潛能降低[67]

Table 10. Deletion mutants with reducded potential for survival

Gene affected	Biological consequence	Environmental consequence
polyhedrin	no polyhedra	low persistence
p10	lack of fibrillar structures	reduced stability;
	fragile polyhedra;impaired polyhedra release	and spread
polyhedron envelope gene (34kDa)	no polyhedron envelope	reduced stability; alkali sensitivity
ecdysteroid UDP -glucosyl transferase (egt)	accelerated molt	shortened LT50; reduced virus yield
chitinase	impaired insect lysis	reduced spread

表十一、以共同包涵病毒方式施用時無包涵體突變種在田間之存活情形[67]

Table11. Survival of occlusion body-minus deletion mutants in the field when applied as co-occluded virus

Year applied	Polyhedrs released/ha	% OB deletion mutant
1989	1 x 1014	42%
1990		13. 8%
1991		4. 5%

最近的進展是將細胞內病毒粒子，也就是等待包涵的未包涵病毒(preoccluded virus) 調製成製劑噴灑。但避免共同包涵的過程則不易控制[67]。

第二個策略是以病毒內在自殺機制做爲基礎來擬議。此種自殺式桿狀病毒，在實驗室飼育的昆蟲體內能產生多角體，但田間的昆蟲棲群則否。此類病毒在核多角體基因的轉錄起始點

(transcriptional start site)之附近含有大腸桿菌 LacI repressor 序列。LacI編碼序列可借 p10啓動子之控制插入到多角體基因之上游位置。如 Lac I蛋白與repressor 序列結合則阻止了多角體的轉錄。當多角體被釋放到田間時，重組病毒可以感染且殺死昆蟲，但只能生產無包涵體的病毒粒子，故不能在環境中存活(67)。

第三個策略是在殺蟲基因的上游封入可誘發啓動子(inducible promotor)，這些啓動子包括溫度敏感，金屬或荷爾蒙可誘發啓動子。使得多角體僅在被誘發的條件下，譬如在生產時產生，但在田間則否。第二和第三個策略的缺點在於在田間時重組病毒會回復到野生型(67)。

結　論

由於桿狀病毒有許多先天性之缺陷，包括殺蟲範圍窄、殺蟲速度慢、易受紫外線破壞、生產不易而成本高等，致使桿狀病毒在蟲害防治上之應用受到侷限。吾人可採取多項方法，針對上述之缺點提出解決之道。可自田間分離寄主範圍廣的病毒，其中芹菜夜蛾多核衣殼核多角體病毒其核酸內切限制 模式和病原性均與 AchNPV不同(44)，可感染鱗翅目10個科的30餘種昆蟲(26)，生體外之毒力測試顯示此病毒可感染擬尺蠖，小菜蛾 (*Plutella xylostella*)，菸草青蟲，玉米穗蟲(*H. armigera*)，家蠶和甜菜夜蛾(*S. exigua*) 等細胞系(6,44)。頗具開發之潛力，目前 Zeneca 農藥公司對此病毒投下相當的人力，企圖儘早將此病毒開發上市。另外亦可找尋毒力强之天然品系或經遺傳工程改造來增加毒力、提高殺蟲速率及殺蟲範圍。病毒增强因子之研究和製劑改良，也分別可以增加殺蟲效果和在田間與櫥架之持續性。發展昆蟲細胞無血清培養基，篩選高病毒產量之昆蟲細胞品系，可降低病毒在生體外生產之成本。建立自動化昆蟲大量飼育、病毒生產及回收之流程則爲生體內量產病毒必需採行的方案。

再者，各類專家、學者之間的整合與合作，亦是攸關以桿狀病毒防治害蟲成敗的關鍵。這些研究人員包括在實驗室內研究的遺傳工程專家；能減輕環境風險且能改善效果的生態學者；蟲害管理專家和法規及推廣人員。事實上良好的團隊合作，有助於避免重複過去所犯的錯誤。我們深信有廉價而品質良好、殺蟲範圍廣、效果好的病毒殺蟲劑之供應，配合經過整合後之防治策略，可預期以桿狀病毒來防治害蟲，會以緩慢但穩健的腳步向前邁進。

參考文獻

1. 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。植保會刊 37: 169-177。
2. 陳秋男。1978。作物蟲害管理的生態學基礎 科學與技術 1 : 93-100。
3. 高穗生、夏維泰、黃莉欣。1991。核多角體病毒添加展著劑對甜菜夜蛾幼蟲致病效果之影響。中華昆蟲 11: 330-334。
4. 高穗生、黃莉欣。1992。甜菜夜蛾核多角體病毒紫外線保護劑之效果評估。 中華昆蟲 12: 31-40。
5. 劉彥文、龐義、蒲蟄龍。1995。斜紋夜蛾核多角體病毒與甜菜夜蛾型多角體病毒異源重組擴大殺蟲譜。第六屆全國殺蟲微生物學術討論會，中國微生物學會、中國昆蟲學會主辦。1995年 4

月2 日至5日・廣州。議程及論文摘要 p.89。

6. 錢鋒、余澤華、陳曲侯。1995。芹菜夜蛾核型多角體病毒感染五種昆蟲細胞系的研究。第六屆全國殺蟲微生物學術討論會，中國微生物學會、中國昆蟲學會主辦。1995年4月2日至5日。廣州。議程及論文摘要 p.102。
7. 龐義、姚斌、范雲六、趙榮敏、王天原、王珣章、龍燊新、莊美寶。1995。利用蝎毒基因改良桿狀病毒殺蟲劑。昆蟲天敵 17: 90-92。
8. Bedford, G. O. 1981. Control of rhinoceros beetle by baculovirus. In: Microbial Control of Pests and Pest Diseases. (Burges,H. D., ed.) pp.409-426. Academic Press. London and New York.
9. Biever, K.D., Andrews, P. L., Andrews, P. A. 1982. Use of a predator, *Podisus maculiventris,* to distribute virus and initiate epizootics. J. Econ. Ent. 75 : 150-152.
10. Carbonell, L. F., Hodge, M. R., Tomalski, M. D., and Miller, L. K.1988. Synthesis of a gene coding for an insect-specific scorpion neurotoxin and attempts to express it using baculovirus. vectors. Gene 73: 409-418.
11. Conway, R. G. 1977. Man versus Pests. In : Theoretical Ecology. (May, R. M., ed.) pp. 356-386. Blackwell Scientific Publns., Oxford, UK, 2nd edn.
12. Copping, L. G. 1993. Baculoviruses in Crop Protection. (DS85). PJB Publications Ltd. 124pp.
13. Derksen, A. C. G., and Granados, R, R. 1988. Alteration of a lepi-dopteran peritrophic membrane by baculoviruses and enhancement of viral infectivity. Virology 167: 242-250.
14. Deseo, K. K. V., Rovesti, L. 1992. Lotto Microbiologica Control Fitofagi Teoriae Practico. Edagricole, Bologna, pp. 156-157.
15. Dickler, E., and Huber, J. 1984. Das Apfelwicker Granulosevirus: Stand der Forschung und Moglichkeiten seiner Einfuhrung in die Obstbaupraxis. Gesunde Pfangen 36: 285-289.
16. Eldridge, R., O'Relly D. R., and Miller, L. K. 1992 . Efficacy of a baculovirus pesticide expressing an eclosion hormone gene. Biological control 2 : 104-110.
17. Entwistle, P. F. 1983. Control of insects by virus diseases. Biocontrol News and Information 4 : 203-225.
18. Entwistle, P. F., and Evans, H. F. 1985. Viral Control. In: Compre-hensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. (Gilbert, L. I., and Kerkut, G. A., eds.) Vol. 12. pp. 347-412. Pergamon Press, Oxford, UK.
19. Entwistle, P. F. 1986. Epizootiology and strategies of microbial control. In: Biological Plant and Health Protection.(Franz, J. M., ed.) pp. 257-278. G. Fischer Verlag. Stuttgart. New York.
20. Fluckiger, C. R. 1982. Untersuchungen uber drei Baculovirus Isolate des Schalenwicklers *Adoxophyes orana* F. V. R.(Lep., Tortricidae), dessen Phanologie und erste Feldversuche, als Grundlagen zur mikrobiologishen Bekampfung dieses Obstschadlings. Mitt. Schweiz. Entomol. Ges. 55: 241-245.
21. Francki, R. I. B., Fauquet, C. M., Knuddson, D.; and Brown, F. (eds.). 1991. Classification and nomenclature of viruses. Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Archives of Virology Supplementum 2,450 pp.

22. Goto, C. 1990. Enhancement of a nuclear polyhedrosis virus (NPV) infection by a granulosis virus (GV) isolated from the spotted cutworm, *Xestia c-nigrum* L. (Lepidoptera : Noctuidae). Appl. Entomol. Zool. 25: 135-137.
23. Granados, R. R., and Federici, B. A. (eds.). 1986. The Biology of Baculoviruses (two volumes) pp. 275+276. CRC Press. Boca Raton, USA.
24. Hammock, B. D., Bomming, B. C., Possee, R. D., Hanzlik, T. N., and Maeda, S. 1990. Expression and effects of the juvenile hormone esterase in a baculovirus vector. Nature 344 : 458-461.
25. Hara. S., Tanada, Y., and Omi, E. M. 1976. Isolation and character-ization of a synergistic enzyme from the capsule of a granulosis virus of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta.* J. Invertebr. Pathol. 27: 115-124.
26. Hosteller, D. L., and Pultter, B. 1991. A new broad host range polyhedrosis from a celery looper, *Anagrapha falcifera* (Kirby), (Lepidoptera: Noctuidae). Environ. Entomol. 20: 1480-1488.
27. Huger, A. M. 1966. A virus disease of the Indian rhinoceros beetle *Oryctes rhinoceros* caused by a new type of insect virus *Rhabdio-virus oryctes* gen. n. sp. n. J. Invertebr. Pathol 8 : 38-51.
28. Huger, A. M. 1973. Grundlagen zur biologishen Bekampfung des Indishen Nashornkafers, *Orycetes rhinoceres* (L.) mit *Rhabdiovirus orycetes* Histopathologie der Virose bei Kafern. Z. Angew. Entomol. 72 : 309-319.
29. Hughes, P. R., Wood, H. A., Breen, J. P., Simpson, S. F., Duggan, A., and Dybas, J. A. 1994. Genetic enchancement of baculovirus pesticides with an insecticidal spider toxin : cessation-of-feeding ?assays and time-to-death assays with several insect species. Proc. VIth International Colloquium on Invertebrate and Microbial Control. Montpillier, Framce. p.160.
30. Hukuhara, T., and Zhu, Y, 1989. Enhancement of *in vitro* infectivity of a nuclear polyhedrosis virus by a factor in the capsule of a granulosis virus. J. Invertebr. Pathol. 54: 71-78.
31. Hukuhara, T., Arga, H., and Kobayashi, M. 1969. On the granulosis 0f *Hyphantria cunea* Drury. Jpn. J. Appl. Entomol. Zool. 13: 1-4.
32. Hukuhara, T., Tamura, K., Zhu, Y., Abe, H., and Tanada, Y. 1987. Synergistic factor shows specificity in enhancing nuclear polyhe-drosis virus infections. Appl. Entomol. Zool. 22: 235-236.
33. Ignoffo, C. M., Garcia, C., Hostetter, D. L., and Pinnell, R. E. 1980. Transplanting: a method of introducing an insect virus into an ecosyatem. Environ. Ent. 9 : 153-154
34. Kalmakoff, J., and Crawford, A. M. 1982. Enzootic virus control of Wiseana spp. in a pasture environment. In: Microbial and Viral Pesticides. (Kurstak, E., ed.) pp. 435-448. Marcel Dekker, New York.
35. Korth, K. L., and Levings III, C.S. 1993. Baculovirus expression of the maize mitochondrial protein URF13 confers insecticidal activity in cell cultures and larvae. PNAS USA 90:3388-3392.
36. Kozuma, K., and Hukuhara, T. 1991. Synergistic factor of an army-worm granulosis virus contains phosphatidylcholine. J. Invertebr. Pathol. 59: 328-329.
37. Lowe, R. E., and Paschke, J. D. 1968a. Simultaneous infection with the nucleopoyhedrosis and granulosis viruses of *Trichoplusia ni.* J. Invertebr. Pathol. 12: 86-92.

38. Lowe, R. E., and Paschke, J. D. 1968b. Pathology of a double viral infection of *Trichoplusia ni.* J. Invertebr. Pathol. 12: 438-443.
39. Maeda, S. 1989. Increased insecticidal effect by a recombinant baculovirus carrying a synthetic diuretic hormone gene. Biochem. Biophys. Res. Commun. 165 : 1177-1183.
40. Marschall, K. M., and loane, I. 1982. The effect of re-release of *Oryctes rhinoceros* baculovirus in the biological control of Rhin-oceros bettle in Western Samoa. J. Invertebr. Pathol. 39: 267-276.
41. Martens, J. W., Honee, G., Zuidema, D.; Van Lent, J. W. M., Visser, B., and Vlak J. M. 1990. Insecticidal activity of a bacterial crystal protein expressed by a baculovirus recombinant in insect cells. Appl. Environ. Microbiol. 56 : 2764-2770.
42. Martignoni, M. E., and Iwai, P. J. 1986. A catalog viral diseases of insects, mites, and ticks. USDA Forest Service PNW-195. Washing-ton, USA.
43. Matthews, R. E. F. 1982. Classification and nomenculture of viruses Intervirology. 17: 1-199.
44. McIntosh, A. H. 1991. *In vitro* infectivity of a clonal isolate of *Synagrapha falcifera* (celery looper) multiple nuclear polyhedrosis virus. J. Invertebr. Pathol. 57: 441-442.
45. Merrywheather, A. T., Weyer, U., Harris, M. P. G., Hirst, H. M., Booth, T., and Possee, R. D. 1990. Construction of genetically eng-ineered baculovirus insecticides containing the *Bacillus thuriniensis* subsp. kurstaki HD-73 delta endotoxin. J. Gen. Virol. 71:1535-1544.
46. Mohamed, M. A., Coppel, H. C., Hall, D. J., and Podgwaite, J. D. 1981. Field release of virus-sprayed adult parasitoids of the European pine sawfly (Hymenoptera: Diprionidiae) in Wisconsin. Gt. Lakes Ent. 14: 177-178.
47. Moore, S. G., Kalmakoff, J., and Miles, J. A. R. 1973. Virus diseases of Porina (*Wiseana* spp. Lepidoptera : Hepialidae). II. Transmission trials. N. Z. J. Zool. 1:85-95.
48. O'Relly, D. R. 1992. Improvement of a baculovirus pesticide by deletion the egt gene. In: Proceedings, Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases, 1992 Brighton, November 23-26, 1992. Farm, UK; British Crop Protection Council. pp.387-392.
49. O'Relly, D. R., and Miller, L. K. 1989. A baculovirus block insect molting by producing ecdysteroid UDP-glucosyl transferase. Science 245: 1110-1112.
50. Ohba, M., and Tanada, Y. 1983. A synergistic factor enhances the *in vitro* infection of an insect baculovirus. Naturwissenschaften 70: 613-614.
51. Ohba, M., and Tanada, Y. 1984a. *In vitro* enhancement of nuclear poly-hedrosis virus infection by the synergistic facto of a granulosis virus of the armyworm *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noc-tuidae). Ann. Virol. (Inst. Pastuer) 135E: 167-176.
52. Ohba, M., and Tanada, Y. 1984b. A synergistic factor of an insect granulosis virus agglutinates insect cells. Experientia 40: 742- 744.
53. Pang, Y., Frutos, R., and Federici, B. A. 1992. Synthesis and toxicity of full-length and truncated bacterial CryIVD mosquitocidal proteins expressed in lepidopteran cells using a baculovirus vector. J. Gen. Virol. 73: 89-101.

54. Patterson, R, M. Selkirk, J. K., and Merrick, B. A. 1995. Baculovirus and insect cell gene expression : review of baculovirus biotechnology. Environ. Health Persp. 103 : 756-759.
55. Roberts, H. 1979. *Lymantria ninayi* B. Br. (Lep. Fam. Lymantriidae) a potential danger to *Pinus* afforestation in the highlands of Papua New Guinea. Tropical Forestry Research Note SR 37. Papua new Guinea, 12 pp.
56. Southwood, T. R. E. 1977. The relevance of population dynamic theory to pest status. In: Origins of Pest, Parasite, Disease and Weed Problems. (Cherrett, J. M., and Sager, G. R., eds.) Blackwell Scientific Publns., Oxford, UK.
57. Stewart, L. M. D., Hirst, M., Ferber, M. L., Merrywheather, A. T., Caylay, P. J., and Possee, R. D. 1991. Construction of an improved baculovirus insecticide containing an insect-specific toxin gene. Nature 352: 85-88.
58. Stoddard, P. J. 1980. "Persistence and Transmission of Baculoviruses in Insect Populations in Alfalfa." Ph. D. Thesis University of California, Berkeley.
59. Summers, M. D., Engler, R., Falcon, L. A., and Vail, P. 1975. Baculovi-viruses for insect pest control: safety considerations. American Society for Microbiology, Washington, USA, pp.186.
60. Tanada,Y. 1956. Some factors affecting the susceptibility of the army-worm, to virus infections. J. Econ. Entomol. 49: 52-57.
61. Tanada, Y. 1959. Synergism betweet two viruses the armyworm, *Pseudaletia unipuncta* (Haworth) (Lepidoptera, Noctuidae). J. Insect Pathol. 1: 215-231.
62. Tanada, Y., and Hukuhara, T. 1971. Enhanced infection of a nuclear-polyhedrosis virus in larvae of the armyworm, *Peseudaletia unipuncta,* by a factor in the capsule of a granulosis virus. J. Invertebr. Pathol. 17: 116-126.
63. Tanada, Y., Himeno, M., and Omi, E. M. 1973. Isolation of a factor, from the capsule of a granulosis virus, synergistic for a nuclear polyhedrosis virus of the armyworm. J. Invertebr. Pathol. 21: 31-40.
64. Tanada, Y., Hess, R. T., and Omi, E. M. 1975. Invasion of a nuclear polyhedrosis virus in midgut of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta,* and the enhancement of a synergistic enzyme. J. Invertbr. Pathol. 26: 99-104.
65. Tomalski, M. D., and Miller, L. K. 1991. Insect paralysis by baculovirus-mediated expression of a mite neurotoxin gene. Nature 352: 83-85.
66. Uchima, K., Harvey, J. P., Omi, E. M., and Tanada, Y. 1988. Binding granulosis virus of the armyworm (*Pseudaletia unipuncta*). Insect Biochem. 18: 645-650.
67. Vlak, J. M. 1993. Genetic engineering of baculoviruses. In : Opportunities for Molecular Biology in Crop Production. BCPC Monograph No.55 (Breodle, D. J., Bishop, D. H. L., L. G., Copping, Dixon G. K., and Hollomon, D. W., eds.) pp. 11-22. The British Crop Protection Council. Surrey, UK.
68. Volkman, L. E., and Keddy, B. A. 1990. Nuclear polyhedrosis virus path-ogenesis. Seminars in Virology 1: 249-256.

69. Wood, H. A., Hughes, P. R., Simpson, S. F., Breen, J, P. Duggan, A., and Dybas, J. A. 1994. Genetic enhancement of baculovirus pesticides with an insecticidal spider toxins: use of polyhedrin and p10 gene promoters. Proc. VIth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control. Montpillier, France. p. 159.
70. Xu, J., and Hukuhara, T. 1992. Enchanced infection of a nuclear poiyhedrosis virus in larvae of armyworm, *Pseudaletia unipuncta,* by a factor in the spheroids of an entomopoxvirus. J. Invertebr Pathol. 60: 259-264
71. Xu, J., and Hukuhara, T. 1994. Biochemical properties of an enhan-cing factor of an entomopoxvirus. J. Invertebr. Pathol. 63: 14 - 18.
72. Yamamoto, T., and Tanada, Y. 1978. Phospholipid, an enhancing compo-nent in the synergistic factor of a granulosis virus of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta.* J. Invertbr. Pathol. 31: 48-56.
73. Yamamoto, T., and Tanada, Y. 1980. Physicochemical properties and location of capsule components, in particular the synergistic fac-tor, in the occlusion body a granulosis virus of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta.* Virology 107: 434-440.
74. Young, E. C. 1974. The epizootiology of two pathogens of the coco-nut palm rhinoceros beetle. J. Invertebr. Pathol. 24: 82-92.
75. Zelazny, S. 1973. Studies on *Rhabdiovirus orycetes.* II Effect on adults of *Orycetes rhinoceros.* J. Invertebr. Pathol. 22: 122-126.
76. Zhu, Y., Hukuhara, T., and Tamura, K. 1989. Location of a synergi-stic factor in the capsule of a granulosis virus of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta.* J. Invertebr. Pathol. 54: 48-56.

Control of Insect Pests by Baculoviruses

Suey-sheng Kao
Bipesticide Department, Taiwan Agricultural Chemicals and
Toxic Substances Research Institute

Abstract

Baculoviruses (BVs) are natural pathogens of insects with great potential as pest control agents, due to their infectivity, lethality storage stability, safety for non-target organisms and environment. Several BVs have been registered and successfully used as short-term insecticides in the control of a variety of insect pests. However, based on the understanding the r-K strategy patterns of insect hosts, other approaches including epizootic prediction, classical biological control, semi-classccal biological control, virus resource management, parasitoid and predator support, autodissemination, early introductions and lattice introductions have also shown some promise in the suppres- sion of insect population. In spite of many advantages of BVs, some drawbacks including lack of virulence, limited host range, relatively slow speed of action and low field stability limited their use in pest control. A number of strategies has been identified to improve their insecticidal properties which include: genetical engineering of BVs, advancement of formulation, or utilization of viral enhancing factors. The approaches of genetic modification of viral genome include (i) the incorporation of genes encoding insect-specific hormones, enzymes, proteins and toxins, (ii) heterologous recombination of BVs, (iii) the deletion of egt gene. And, the possible risks associated with the release of genetically modified BVs were addressed and the construction of recombinants with biological safety was also discussed in this review.

Key words: baculoviruses, control, insect pest.

「植物保護新科技研討會」專刊
臺灣省農業試驗所特刊第57號 pp. 181-191 (1996)

天敵的遺傳改良

何琦琛　羅幹成
臺灣省農業試驗所應用動物系

摘要：生物防治中，天敵常不能達成壓制害蟲族群的任務。經由在遺傳上改良天敵或可改善此問題，已有一些利用育種來改進天敵、性比、對不同溫度的適應性及抗藥性的研究。其中最成功的當數西方捕植蟎經抗多種農藥品系的篩選培育。釋放於田間後此抗性捕植蟎品系能在田間立足、持續、並成功發揮抑制葉蟎族群之功能。此外，更在該捕植蟎成功地進行了基因轉殖測試。本文簡介了有關的研究工作。臺灣亦在進行生物防治工作，宜監測大量繁殖的天敵有無不良變異、選育高生殖能力的品系以助益於天敵的大量繁殖、或是培育適於在不同作物或不同季節釋放的天敵品系。而抗藥性之天敵的選育可能爲目前最值得進行的工作。在短期作物上，經遺傳改良之天敵在釋放後能持續至作物收割後即可，長期持續之能力或非必要。

關鍵詞：天敵、遺傳改良。

前　言

大量而普遍地施用農藥所造成的一些負面影響，諸如環境污染、危害野生動物、農藥殘毒等，已經喧嚷多年。由於經濟發展，收入提高而生活富裕後，人類愈來愈珍惜自我的生命健康，主也愈來愈關心生活環境的品質，更突顯了這些負面影響。因此，如何在IPM中盡量利用天敵，減少農藥的使用，也就成了世界上植物保護工作的主流。因爲頻繁使用農藥，許多害蟲對多數農藥產生抗性，而新農藥的開發速度又趕不上抗性產生的速度，乃使得可選用的農藥數目日漸減少，更加重了這儘量運用天敵少用農藥的需求。然而雖有此需求，卻往往事與願違，缺乏足夠的可實際運用於農業生態系中的有效天敵。許多在自然界能抑制害蟲族群的天敵在農業生態系中或是所引入釋放的目標區中，因著各種原因，未能如預期地發揮防治功效。而尋求新的有效天敵又非易事，則是否能像人類在過去數千年中以育種方式對家蠶和蜜蜂進行遺傳改良一般來改良天敵呢?乃查閱文獻而完成本文，文中資料有很大的比例來自於M. A. Hoy 博士的研究與文章。

早在1916年Mally即對選育有益昆蟲優良特性有所討論(35)。其後，DeBach也論及許多原本在抑制害蟲族群上極爲有效的天敵，引入新地區後卻立足失敗，或雖立足但不能有效防治害蟲，可能因爲它們原先所適應之環境與引進地不同，經由選育或可培育出能適應引入地區之品系。並建議就天敵對天候的耐受性、與寄主之同步性、辨認寄主能力、卵對濕度的耐受力、生殖力、性比、花粉取食、抗藥性等進行篩選(10)。而Sailer更認爲"....there is no reason why a wide variety of useful characters cannot be similary moved from one species to another and combined to form strains of insect parasites or plant pollinators that are superiorly adapted to the environments where they are

needed"[6](筆者侈譯爲"沒有理由爲什麼恁多的有益特性不能同樣地從一種昆蟲轉移至另一種昆蟲，而結合成一個對需要它們的地區的環境具有卓越適應力的寄生性昆蟲或傳粉昆蟲品系")。

正如他們所認爲，生物防治所應用的天敵，不論捕食性或寄生性，均可經由遺傳改良來增進效能，使生物防治或害蟲綜合管理(IPM)工作更實際可行。

天敵昆蟲的遺傳改良

天敵遺傳改良研究工作，數十年來一直斷斷續續的進行者。不同的學者基於需要各自進行者研究。最早的應屬Wilkes的研究，他因European spruce sawfly爲適應於較低溫度之害蟲，乃對其寄生蜂(*Dahlbominus fuscipennis* (Zett.)) 就溫度的適應性、生殖力進行篩選，而得到較喜好25 ℃及9℃的兩不同品系[52]。並將不孕性雄蜂數由35%降至約8%，得到生殖力較高的雌蜂，每隻雌蜂所產生的後代數由48隻增至68隻，成蟲壽命亦較長。使用篩出之高產品系後，得於3年中將釋放寄生蜂數自四千七百萬增至二億二千二百萬隻[53]。Simmonds 經由僅繁殖產生較多雌性後代的蜂群，而將寄生codling moth的*Aenoplex carpocapsae* (Cushman)族群性比提高[46]。

Pielou & Glasser則在18代中將寄生蜂*Macrocentrus ancylivorus* Rohwer對DDT抗力提高了5-6倍[36]，Robertson更得到12倍之DDT抗性[40]，但雙方均未進行田間釋放測試。Allen因爲*M. ancylivorus*係利用potato tuberworm爲寄主而大量繁殖，乃嚐試發展以potato tuberworm 飼養 orient fuit moth之寄生性天敵*Horogenes molestae*(Uchida)的方法，期能利用相同配備來繁殖後一天敵。在飼養數十代逐漸改換寄主後，成功的改變了*H. molestae*的寄主喜好，改以potato tuberworm 飼育[5]。

White *et al.*爲能在夏天較高溫冬天較低溫之加州內陸地區施用*Aonidiella aurantii*(Mask.)之寄生蜂*Aphytis lingnanensis* Compere，在實驗室中經100餘代選育後得到同時對36.1℃及1.7℃較適應之品系，且其壽命較長。然而因引進之同屬另一種寄生蜂*A. melinus* DeBach 對該地區適應良好，迅速散布侵入試驗區，使田間評估深受影響，無法完成[52]。

爲防治胡桃蚜蟲Hoy及其同仁在實驗室選育了抗carbaryl之*Chrysoperla carnea*(Stephens)品系[12,13]及*Aphytis melinus*品系[41]，和抗azinphosmethyl之Trioxys pallidus (Haliday)品系[23]，後者釋放於加州之五walnut園中，在四園中立足，持續存在於全生長季中，如能越冬即可加入蚜蟲之IPM中。

其它還有一些類似的研究，這些研究大多均止於實驗室中的研究探討,而未進行田間應用評估。而缺乏田間實際應用的肯定，也正是長久以來學者們躊躇於進行這方面的研究的原因之一[6,19]。

捕植蟎的遺傳改良

捕植蟎遺傳改良工作包括了對三種在生物防治中應用得最多的西方盲走蟎(*Metseiulus occidentalis* (Nesbitt))、法拉斯捕植蟎(*Amblyseius fallacis* (Garman))、智利捕植蟎(*Phytoeiulus persimilis* Athias-Henriot)等的研究，其中又以對前者的工作最完備、最受囑目。在實驗室經由選汰及品系間的雜交，育成了對多類農藥具抗性的品系，釋放至田間後能成功的立足、繁殖、抑制葉蟎族群、擴散並繼續保有對農藥的抗性。

M. occidentalis

*M. occidentalis*對農藥的抗性是Hoyt在1969年首先報導的[30]，他發現美國華盛頓州蘋果園中的西方盲走蟎對azinphosmethlyl 有抗性，能在田間正常施用此藥防治害蟲時繼續存活，並抑制葉蟎族群。此抗性品系被引入加州的蘋果園，並在該地建立族群[8]。其後又引至澳洲[39]及紐西蘭[49]，並在該地立足。

Hoy等人於1977-1978年廣泛調查美國加州田間本蟎族群對農藥之感受性，發現梨園及葡萄園中之此蟎族群普遍對有機磷劑具抗性，唯抗性程度變異甚大[24,28]。然而未發現對氨基甲酸鹽劑及合成除蟲菊劑之抗性[24,42,43]，乃於實驗室中篩選此蟎對permethrin及carbaryl之抗性。經兩年之篩選後，從採自華盛頓州之族群中篩得抗permethrin品系，採自加州本身之族群則未能篩得此抗性。選汰18次後LC50提高了10倍，並對其它合成除蟲菊劑有輕微抗性；還保留了對OP的抗性。釋放此permethrin-OP抗性品系於加州蘋果園及杏園、華盛頓州蘋果園及奧勒岡州梨園均能立足，園中一再施用permethrin後仍然存活、越冬，並從釋放株散布至鄰近植株。但是，必須以permethrin將原來自然存在的感受性族群消滅才能確保其立足。其後因permethrin並未參加果園害蟲管理系統而未多做應用[25,29]。

*M. occidentalis*對permethrin 的抗性由多個基因共同決定，是以在田間容易因與自然界的感受性族群雜交而喪失抗性。在使用時須釋放於無自然族群的園中，或先施用permethrin將自然族群消滅後再釋放，才能確保抗性長期持續於田間[19,25]。

同一時段也篩得了抗carbaryl的品系，一如抗permethrin品系，它也保有對OP的抗性，能抗benomyl及propoxur。1979年小面積釋放於杏園中，此蟎成功地立足，抑制葉蟎族群，經歷施用carbaryl後依然存續、越冬，並擴散開來[17,27,42,43]。此後又將此品系與在葡萄園中發現的抗sulfur品系[26]交配，選育得抗carbaryl-OP-sulfur (COS)品系。與抗permethrin 品系交配，選育得抗carbaryl-OP-permethrin品系。釋放在加州的蘋果、梨、葡萄、杏園及華盛頓州、奧勒岡州之蘋果、梨園，均能立足於不同果園及不同氣候下防治葉蟎。其中COS品系經大量繁殖後釋放於杏園中，防治葉蟎的表現不輸自然發生的*M. occidentalis*族群。釋夜園每年每英畝因減少施藥可節省$24-44元，調查證實有一半杏農採用此抗藥性捕植蟎，亦即每年因選用此抗藥性品系之天敵防治杏園葉蟎可節約施用農藥經費$21,256,000元[14]。經濟效益極爲可觀，而此數字僅計算及杏園而已，其它亦釋放本蟎之果園如蘋果，梨，桃，梅，葡萄等尚未計入。目前此多元抗性之捕植蟎已在加州商業生產供應農民，以杏園所用爲例，它可抗carbaryl、sulphur、phosmet、diazinon及azinphosmethyl，使杏農可放心施藥防治其它害蟲，而無葉蟎族群大發生之虞[18]。

此外亦篩選了抗dimethoate的品系，於1978年釋放葡萄園評估其應用性，翌年春天此蟎仍存在於釋放園，但抗性有所衰減。然而主要因其抗性遜於該藥田間推廣濃度，是以終止此品系開發應用[44]。相同之狀況亦發生於抗methomyl品系上，選汰後LC50雖提高12倍，仍不足以抗推廣濃度，只得放棄。

其後又從抗carbaryl-OP品系再選育出在19℃及8h光照下不會休眠的複合品系，運用在商業生產之玫瑰溫室中，能在施用農藥情形下仍存活，對二點葉蟎族群產生相當良好之抑制[11]。

Amblyseius fallacis

Croft & Meyer 發現採自Indiana州的*A. fallacis*對carbaryl 的抗性增加了25-77倍，乃在實驗室

對其加壓選育得到兼抗 azinphosmethly 及 carbaryl 的品系。其後未加壓飼育10-25代，抗藥性未消滅[9]。另外從玻璃溫室中兩個抗 azinphosmethly 品系篩選12回合後得到兼抗 permethrin 品系，其抗性增加64倍[47]。

抗carbaryl-OP品系釋放在Illinois及Michigan 蘋果園中，抗性逐年減退，直至與未釋放園自然發生之法拉斯捕植蟎相同。可能原因之一爲與自然發生者雜交，而逐漸喪失抗性。抗 permethrin 兩品系在1980年釋放Michigan蘋果園中，成功越冬，但其中一品系因施用 fenvalerate 而被消滅。

Phytoseiulus persimilis

Schulten & Klashorst 篩選了對parathion具强抗性的品系[45]，同時間內在荷蘭的玻璃溫室中自然篩出了抗性更强的品系，乃未再對前者研究。玻璃溫室中的高溫常限制了本蟎的表現，因此Voroshilov對不同line的智利捕植蟎選育了6-14代後，提高了它的耐熱力[50]。此外，他也將來自加拿大與法國的智利捕植蟎交配選育出具更高生殖力的品系[51]。其後Konig & Hassan爲了在玻璃溫室中使用智利捕植蟎，而從事篩選其對pirimicarb的抗性[32]。

其它

除了對上述工種最著名的捕植蟎的抗藥性品系篩選研究外，也有學者進行對其它捕植蟎的抗藥性品系研究，如Markwick篩選 *Tphlodromus pyri* 對cypermethrin的抗性[35,48]、Huang等人對 *A. nichols* 的抗藥性研究等[31]。

臺灣的天敵遺傳改良研究

捕植蟎

臺灣利用捕植蟎防治葉蟎已有多年，釋放在草莓、茶、桑及木瓜等農作物上[1,3,4,32]都有很好的效果。但是常需在早春甚或冬季釋放捕植蟎，亦即必須在冬季進行大量繁殖工作，在養蟲室中定溫下或溫室中加溫以最快速度大量繁殖捕植蟎，採收後釋放至作物上防治葉蟎。於是暖溫(25 -28℃)下繁殖出的捕植蟎釋放於涼(冷)溫下的田園，雖然臺灣寶島的冬季並不寒冷，冬季夜間的冷溫仍可能對暖溫下大量繁殖出的捕植蟎有不利的影響。實需選育可在暖溫下快速繁殖，又能適應冷溫(10-15℃)的捕植蟎品系，釋放田間後才能迅速發揮功效，抑制葉蟎族群。農試所曾試圖在10 ℃下飼育法拉斯捕植蟎，以選育適合需要的品系，飼育數代後中斷未繼續，相當可惜(李文台，私人通訊)。

以臺灣的害蟲防治現況而言，無法將化學防治完全免除。是以天敵在田間必定會遭逢農藥的洗禮，或因防治相同的害蟲，或因防治它種害蟲。如何在不能避免施用農藥的情形下，在田間保存天敵即成爲極重要的工作目標。欲達成此目標，勢需尋求對天敵較安全選擇性農藥，或是培育抗藥性天敵品系。大量繁殖捕植蟎供田間釋放，首需大量繁殖葉蟎做爲捕植蟎的食物。農試所在大量繁殖葉蟎時，常被溫氏捕植蟎侵入，大量取食葉蟎，使得葉蟎密度低迷不振，影響大量繁殖進度至鉅。初期對策爲篩選出能殺死捕植蟎但對葉蟎影響甚微的 decamethrin 來殺滅侵入葉蟎族群中的捕植蟎，然而此藥劑在數個月內迅即失去功效。而後乃改用 mevinphos，依然在使用數月後失去功效。最後 Ho & Chen 發展出熱水浸泡的方法後才解決問題[15]。溫氏捕植蟎爲臺灣農田中最常見的捕植蟎，它的發育速率不輸前述三種捕植蟎，而繁殖力及捕食量不輸法拉斯捕植蟎及

西方盲走蟎[16]，極具利用價值。前述狀況顯示它具有發展抗藥性的能力，本文第二作者對其進行了抗藥性品系選育工作，已有極佳結果，將於近日內發表。

寄生蜂

農業試驗所陳炳輝博士在研究寄生蜂 *Trichogramma chilonis* 時獲得了一品系，未交尾的雌蜂所產下的具單套染色體的卵能發育成雌蜂[7]。也就是一隻未交尾的雌蜂能單獨負擔起散布至新地區，生產繁殖後代建立族群的仕務。在完全瞭解它的遺傳機制後，或許可利用生物技術將此特性轉殖至其它天敵，創造出其它天敵的產雌性孤雌生殖品系，大爲助益生物防治.

農藥在臺灣施用得相當厚重，對一些主要害蟲如葉蟎、薊馬等農民紛紛發出"有效防治藥劑是什麼"的疑問。這並非農民對農藥或農藥施用技術欠做瞭解，事實上的確有此困擾。筆者等調查推廣殺蟎劑對採自不同地區不同作物上神澤氏葉蟎和二點葉蟎的藥效時，嚇然發現所測試的殺蟎劑在推廣濃度下，有的已全然無效，有的對部分樣品有效，有的在提高至四倍濃度後才有效，只有三種受測殺蟎劑對大多數樣品有毒效[2]。在這種背景下，如何針對不同作物發展以天敵爲主、農藥爲輔的害蟲防治策略，實爲刻不容緩的工作。對現有天敵的改良，使其能嵌合適應入這些策略中，乃成爲極富潛力的工作。

而臺灣作物種類繁多，各種作物的種植季節與管理方法多有不同。在不同作物上運用同一天敵時，應注意此種因栽培管理不同而造成的作物生態環境條件不同有無影響及天敵的表現，進而影響對害蟲的防治效率。這方面的考量也成爲天敵遺傳改良的工作項目，改良出的天敵品系當可發揮更佳的害蟲抑制效能。

天敵遺傳改良研究的各階段工作

Hoy 將天敵選傳改良工作分爲問題的界定、及應用與功效的實證等三個階段、並列出各階段應進行的工作及可能遭遇到的問題[21]，介紹如下。

問題的界定

要做的事有兩項：找出有效的天敵及弄清楚爲什麼它會失敗、需要改良的性狀是什麼？在這階段中、常因對天敵的生物學及行爲所知太少、而不知道應改良什麼性狀、因此多數針對抗藥性及休眠兩性狀進行改良工作。此外、縮短發育期、增加生殖力、改變性比、對溫濕度的耐受性等等改良工作、的確對生物防治有利、但是很難去證明在這方面的改善能幫助天敵表現得更好。

改良品系的發展

首先需先找出此性狀在自然界有什麼樣的變異情形、若無足夠的變異性供選擇、可能得利用基因突變。而突變性狀、可能在非目標基因上亦有所改變、需經大量比較篩選工作來得到可利用的品系、常較費事。找出可用的形性後可行用選育的方式或 rDNA 轉移的方法來培育所要的品系。而後要在實驗室、溫室或田間的籠子裏來評估此品系的好壞。它的寄主範圍或選好如有改變、會影響天敵的效率;對溫濕度的喜好以及休眠性改變後可能會改變地理分布；改良的特性是否能穩定地遺傳給後代、如爲經基因轉殖而改良的性狀、要注意它是否留在原插入的位置。經改良後的天敵、每一案例均應進行以上的評估。

此外，改良後的品系並不一定要在各方面都不輸於原來的品系，端視其需要而定。例如，以

淹沒式 (inundative) 釋放方式應用者，只要能在養蟲室正常交尾，田間是否能正常交尾並不很重要；同時其對棲所的選擇性、散布力及休眠性也不很重要[20]。

實施並以書面證明

1. 田間小區測試：田間釋放、調查評估改良天敵品系的功效及適應性、需發展取樣及評估的技術、並取得釋放許可。
2. 田間大區測試：此時需能大量繁殖該天敵品系、並發展各項族群監測技術。評估項目包括天敵的功效、適應性、持續性、分散力、安全性等等。

   成功的天敵在田間應能表現出下列各點：(1)、在釋放處立足(2)、散布於釋放株上。(3)、繁衍後代。(4)、安全活過施用農藥。(5)、抑制害蟲。(6)、越冬。(7)、散布於釋放園。(8)、持續保有經改良之特性。
3. 實施：通過前二項測試的天敵可實際予以應用、但需有針對改良天敵品系來研究發展、並教育農民使其能接受利用新天敵品系。更需要從事追蹤研究、田間任何變化諸如新作物品種的推廣、使用農藥的改變以及新害蟲的入侵都會影響到改良天敵的表現、甚或能否繼續有效抑制害蟲族群、這些都需要隨時密切追蹤觀察。
4. 書面證明：當此天敵確能在田間發揮功效後、應進行成本效益評估、並將這些情形均做成書面報告。一方面留下記錄、一方面也成爲驗證文件。

生物技術的應用

遺傳基因研究得較完善的是果蠅，它的一些基因被拿來在生物技術基因轉殖上利用。當研究得更透澈後，或許可將同樣的資訊與技術應用於天敵身上[22]。Presnail & Hoy 以微針注射將 pJKP 2 plasmid 注入有發育初期卵雌 MO及 *A. finlandicus* 體內(接近卵處)，利用 PCR 檢驗所產生的後代證實基因轉殖成功[37,38]。雖然所注射的 plasmid 並未含有實際改善捕植蟎遺傳特性的基因，但此種試驗的成功顯示了將來在昆蟲或生物遺傳的研究上如能把具利用價值的基因(如抗藥性基因)分離出來，可以同樣的方式轉殖給捕植蟎，從而迅速地對捕植蟎進行遺傳改良。更進一步地發展後，可將多種所需特性的基因全部轉殖，創造無數的超優良天敵品系來。不論它可能會遇到多少困難，這種遠景極爲令人振奮。

結　論

臺灣的農作物種類繁多，而有效天敵資源有限。同一天敵常被應用於不同作物上防治同一種害蟲或近似種害蟲。不同作物或不同季節的農田裏，生態條件不盡相同，溫度、濕度、日照、通風、生物相等等都有不同。這些因子有可能影響及天敵的表現，過去對這方面甚少加以觀察，爲了確保天敵能有優良表現，應對此方面予以瞭解。如天敵果因此而表現不良，宜探明確實原因來進行天敵品系選育。如此可使我們能更有效率地應用天敵，減少因觀察不明而導至的挫折。同時，過去對天敵的研究中很少去探討天敵的行爲，天敵在田間如何尋找、接近寄主?是否需要棲息空間、補充食物？所釋放的農作物園能否滿足天敵在這方面的需求?這些都對天敵能否發揮功效有很大的影響，應予加強有關的研究。必要時，亦可經由選育來調節天敵的行爲，並配合調整作物管理方

法來改善生物防治的成效。

臺灣的農作物害蟲防治對農藥依賴得相當深，同時害蟲種類也相當多，天敵在田間將其目標害蟲族群壓制後，常常另一種重要害蟲的族群會竄升，因而無可避免地要面臨農藥的洗禮。在此情形下，抗藥性天敵的選育乃成爲極重要的工作，現階段裏應該是天敵遺傳改良中第一優先的工作。另外，生物防治通常需大量繁殖天敵來釋放於田間，如能選育出合適的高產天敵品系，供大量繁殖利用，對整個生物防治工作的助益非同小可。

生物技術爲最近的熱門研究項目，在眾多研究人員的努力下，我們可預期有關的知識及技術將迅速地累積。將來或可如Sailer所言，育出有卓越適應力的天敵品系，亦或能更上層樓，製出超級天敵品系來。屆時，或許眞能將農藥捨棄，生產無農藥的農產品，讓消費者全無顧慮地食用。

不論育出了(改良了)什麼樣的天敵品系，終需在養蟲室中大量飼養。此時，將一如往昔面臨品質管制 (quality control) 的問題[22]。要將改良的特性穩定地維持住，枇要避免天敵特化適應了養蟲室的環境條件。而應用於田間後，更需注意田間任一因子的改變，如作物的新品種、新害蟲、推廣農藥種類的修改...等，均將影響所育出天敵品系的表現，必須適時的發展出相配合的技術以確保生物防治能持續地在作物園中發揮者功效。

參考文獻

1. 何琦琛、陳文華。1991。桑園神澤葉蟎之生物防治。臺灣農業 27: 82-89。
2. 何琦琛、羅幹成、陳文華。1995。臺灣爲害經濟植物之葉蟎種類及12種殺蟎劑對二種主要葉蟎之毒性測試。中華農業研究 44：157-165。
3. 陳惠藏。1986。茶樹神澤葉蟎(*Tetranychus kanzawai*(Kishida))及其天敵長毛捕植蟎(*Amblyseius longispinosus* (Evans)) 之生態研究。台灣茶業研究彙報 5: 83-107。
4. 陳惠藏。1988。茶葉蟎生物防治。台灣茶業研究彙報 7: 15-25。
5. Allen, H. W. 1954. Propagation of *Horogenes molestae,* an Asiatic parasite of the oriental fruit moth, on the potato tuberworm. J. Econ. Entomol. 47: 278-281.
6. Beckendorf, S. K., and M. A. Hoy. 1985. Genetic improvement of arthropod natural enemies through selection, hybridization or genetic engineering techniques. p. 167-187 in Hoy, M. A. and D. C. Herzog [eds] Biological control in agricultural IPM systems. Academic Press, New York.
7. Chen, B. H., R. Kfir, and C. N. Chen. 1992. The thelytokous *Trichogramma chilonis* in Taiwan. Entomol. Exp. Appl 65: 187-194.
8. Croft, B. A., and M. M. Barnes. 1971. Comparative studies on four strains of *Typhlodromus occidentalis.* III. Evaluations of releases of insecticide resistant strains into an apple orchard ecosystem. J. Econ. Entomol. 64: 845-850.
9. Croft, B. A., and R. H. Meyer. 1973. Carbamate and organophosphorus resistance patterns in popualtions of *Amblyseius fallacis.* Environ. Entomol. 2: 691-695.
10. Debach, P. 1958. Selective breeding to improve adaptations of parasitic insects. Proc. 10th Int. Congr. Entomol. 4: 759-767.
11. Field, R. P., and M. A. Hoy. 1986. Evaluation of genetically improved strains *Metaseiulus*

occidentalis (Nesbitt) for integrated control of spider mites on roses in greenhouses. Hilgardia 54: 1-32.

12. Grafton-Cardwell E. E., and M. A. Hoy. 1985. Intraspecific variability in response to pesticides in the common green lacewing, *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae): Hilgardia 53: 1-32.
13. Grafton-Cardwell, E. E. & M. A. Hoy. 1986. Genetic improvement of common green lacewing, *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae): selection for carbaryl resistance. Environ. Entomol. 15: 1130-1136.
14. Headley, J. C., and M. A. Hoy. 1987. Benefit/cost analysis of an itengrated mite management program for almonds. J. Econ. Etnomol. 80:555-559.
15. Ho, C. C., and W. H. Chen. 1992. Control of phytoseiids in a spider mite mass-rearing system (Acari: Phytoseiidae, Tetranychidae). Exp. Appl. Acarol. 13: 287-293.
16. Ho, C. C., K. C. Lo, and W. H. Chen. 1995. Comparative biology, reproductive compatibility, and geographical distribution of *Amblyseius longispinosus* and *A. womersleyi* (Acari: Phytoseiidae). Environ. Entomol. 24: 601-607.
17. Hoy, M. A. 1982. Aerial dispersal and field efficacy of a genetically-improved strain of the spider mite predator *Metaseiulus occidentalis.* Entomol. Exp. Appl. 32: 205-212.
18. Hoy, M. A. 1985a. Integrated mite management for California almond orchards, pp. 299-310. In W. Helle and M. W. Sabelis [eds.] Spider Mites, Their Biology, Natural Enemies and Control 1B. Elsevier, New York.
19. Hoy, M. A. 1985b. Recent advbances in genetics and genetic improvement of the phytoseiidae. Ann. Rev.. Entomol. 30;345-370.
20. Hoy, M. A. 1986. Use of genetic improvement in biological control. Agriculture Ecosystems and Environment 15: 109-119.
21. Hoy, M. A. 1990. Genetic improvement of arthropod natural enemies: Becoming a conventional tactic? pp. 405-417 in R. R. Baker and P. E. Eunn [eds.] New directions in biological control: alternatives for suppressing agricultural pests and diseases. Wiley-Liss, Inc. New York.
22. Hoy, M. A. 1992. Biological control of arthropods; Genetic engineering and enviornmental risks. Biological control 2: 166-170.
23. Hoy, M. A., and F. E. Cave. 1988. Guthion-resistant strain of walnut aphid parasite. Calif. Agric. 42: 4-5.
24. Hoy, M. A., and N. F. Knop. 1979. Studies on pesticide resitance in the phytoseiid *Metaseiulus occidentalis* in California, pp. 89-94. In J. G. Rodriguez [ed.] Recent Advances in Acarology. Academic Press, New York.
25. Hoy, M. A., and N. F. Knop. 1981. Selection for and genetic analysis of permethrin resistance in *Metaseiulus occidentalis:* Genetic improvement of a biological control agent. Entomol. Exp. Appl. 30: 10-18.
26. Hoy, M. A., and K. A. Standow. 1982. Inheritance of resistance to sulfur in the spider mite

predator *Metaseiulus occidentalis.* Entomol. Exp. Appl. 31: 316-323.

27. Hoy, M. A., W. W. Barnett, W. O. Reil, D. Castro, D. Cahn, L. C. Hendricks, R. Coviello, and W. J. Bentley. 1982. Large-scale releases of pesticide-resistant spdier mite predators. Calif. Agric. 36:8-10.
28. Hoy, M. A., D. L. Flaherty, W. Peacock, and D. Culver. 1979. Vineyard and laboratory evaluations of methomyl, dimethoate, and permethrin for a grape pest management program in the San Joaquin Valley of California. J. Econ. Entomol. 72: 250-255.
29. Hoy, M. A., N. F. Knop, and J. L. Joos. 1980. Pyrethroid resistance persists in spider mite predator. Calif. Agric. 34: 11-12.
30. Hoyt, S. C. 1969. Integrated chemical control of insects and biologivcal control of mites on apple in Washington. J. Econ. Entomol. 62: 74-86.
31. Huang, M. D., J. J. Ziong, and T. Y. Du. 1987. The selection for an d genetical analysis of phosmet resistance in *Amblyseius nicholsi.* Acta Entomol. Sinica 30: 133-139.
32. Konig, K., and S. A. Hassan. 1986. Resistance and cross resistance of the predatory mite *Phytoseiulus persimilis* (Athias-Henriot) to organophosphorous insecticides. Z. Ang. Entomol. 101:206-215.
33. Lo, K. C., W. T. Lee, T. K. Wu, and C. C. Ho. 1990. Use of predators to control spider mites (Acarina: Tetranychidae) in the Repulbic of China on Taiwan. p.166-178 in O. Mochida, K. Kiritani, and J. Bay-Petersen eds. The Use of Natural Enemies to Control Agricultural Pests. FFTC Book Series. No. 40.
34. Mally, C. W. 1916. On the selection and breeding of disirable strains of beneficial insects. S. Afr. J. Sci. 13: 191-195.
35. Markwick, N. P. 1986. Detecting variablility and selecting for pesticide resistance in two species of phytoseiid mites. Entomophaga 31: 225-236.
36. Pielou, D. P., and R. F. Glasser. 1952. Selection for DDT resistance in a beneficial insect parasite. Science 115: 117-117.
37. Presnail, J. K., and M. A. Hoy. 1992. Stable genetic transformation of a beneficial arthropod, *Metaseiulus occidentalis* (Acari: Phytoseiidae), by a microinjection technique. Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 7732-7736.
38. Presnail, J. K., and M. A. Hoy. 1994. Transmission of injected DNA sequences to multiple eggs of *Metaseiulus occidentalis* and *Amblyseius finlandicus* (Acari: Phytoseiidae) following maternal microinjection. Exp. Appl. Acarol. 18:319-330.
39. Readshaw, J. L. 1975. Biological control of mites in Australia with an insecticide-resistant predator. J. Aust. Inst. Agric. Sci. 41: 213-214.
40. Robertson, J. G. 1957. Changes in resistnace to DDT in *Macrocentrus ancylivorus* Rohwer (Hymenoptera: Bracondiae). Can. J. Zool. 35: 629-633.
41. Rosenheim, J. A., and M. A. Hoy. 1986. Intraspecific variation in levels of pesticide resistance in field populations of a parasitoid, *Aphytis melinus* (Hymenoptera: Aphelinidae): The role of past

selection. J. Econ. Entomol. 79: 1161-1173.

42. Roush, R. T., and M. A. Hoy. 1981a. Genetic improvement of *Metaseiulus occidentalis:* Selection with methomyl, diemthoate, and carbaryl and genetic analysis of carbaryl resistance. J. Econ. Entomol. 74: 138-141.
43. Roush, R. T., and M. A. Hoy. 1981b. Laboratory, glasshouse, and field sutdies of artificially selected carbaryl resistance in *Metaseiulus occidentalis.* J. Econ. Entomol. 74: 142-147.
44. Roush, R. T., W. L. Pelacock, D. L. Flaherty, and M. A. Hoy. 1980. Dimethoate-resistant spider mite predator survives field tests. Calif. Agric. 34: 12-13.
45. Schulten, G. G. M., G. van de Klashorst, and V. M. Russell. 1976. Resistance of *Phytoseiulus persimilis* A.-H. (Acari: Phytoseiidae) to some insecticides. Z. Angew. Entomol. 80: 337-341.
46. Simmonds, F. J. 1947. Improvement of the sex ratio of a parasite by selection. Can. Entomol. 79: 41-44.
47. Strickler, K., and B. A. Croft. 1982. Selection for permethrin resistance in the predatory mite, Amblyseius *fallacis Garman* (Acarina: Phytoseiidae). Entomol. Exp. Appl. 31: 339-345.
48. Suckling, D. M., J. T. S. Walker, P. W. Shaw, N. P. Markwick, and C. H. Wearing. 1988. Management of resistance in horticultural pests and beneficial species in New Zealand. Pestic. Sci. 23: 157-164.
49. Thomas, W. P., and L. M. Chapman. 1978. Integrated control of apple pests in New Zealand. 15. Introduction of two predaceous phytoseiid mites. Proc. N. Z. Weed and Pest Cont. Conf. 31:236-243.
50. Voroshilov, H. V. 1979. Heat-resistant lines of the mite *Phytoseiulus persimilis* A.-H. Genetika 15: 70-76.
51. Voroshilov, N. V., and L. I. Kolmakova. 1977. Heritability of fertility in a hybrid population of *Phytoseiulus persimilis.* Genetika 13: 1496-1497.
52. Wilkes, A. 1942. The influence of selection on the preferendum of a chalcid (*Microplectron fuscipennis*) and its significance in the biological control of an insect pest. Proc Royal Soc Lond Ser. B 130: 400-415.
53. Wilkes, A. 1947. The effects of selective breding on the laboratory propagation of insect parasites. Proc. Roy. Soc. London Ser. B 134: 227-245.
54. White, E. B., P. DeBach, and M. J. Garber. 1970. Artificial selection of genetic adaptation to temperature extremes in *Aphytis lingnanensis* Compere (Hymenoptera: Aphelinidae). Hilgardia 40: 161-192.

Genetic Improvement of Natural Enemies

Chyi-Chen Ho and Kang-Chen Lo
Department of Applied Zoology, Taiwan Agricultural Research Institute

Abstract

The natural enemies often failed to suppress the pest population. This may be enhanced through genetic improvement on the natural enemies. A few works were carried on the breeding of strains of various natural enemies to improve their fecundity, sex ratio, tolerance to various temperatures, and pesticide resistance. Among these works the selection of multipesticide-resistant strain of Metaseiulus occidentalis (Nesbitt) was most prolific. Released into fields, it survived, persisted, and reduced the spider mite population. In addition, genetic transformation was carried successfully on this mite. These works were briefly introduced. Biological control works have been conducted in Taiwan. It is worthwhile to probe the quality of the mass-reared natural enemies, to improve the fecundity to facilitate the mass-production of natural enemy, to breed strains for the release in various crops or seasons. Currently the selection of pesticide- resistant strain is probably most worthwhile. When crops are harvested within a few months after cultivating, genetic improved strain of natural enemy only needs to last out the harvest for using on these crops. The ability of long-term persistence may not be necessary.

Key words: natural enemy, genetic improvement.

「植物保護新科技研討會」專刊
臺灣省農業試驗所特刊第57號 pp. 193-202 (1996)

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) 亦被認爲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) 賦于桿狀病毒可作爲害蟲防治的微生物[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爲病毒殺蟲劑 (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現，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强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爲農業界所接受。

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：眞桿狀病毒亞科(Eubaculovirinae)和裸桿狀病毒亞科(Nudibaculovirinae)[28]。眞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，此病毒稱之爲包埋性病毒(occluded viruses，簡稱OVs)或稱多角體病毒(polyhedra-derived viruses, PDVs)。由於封埋體和OVs之不同，可分成兩個屬，核多角體病毒屬(nucleopolyhedroviruses，簡稱NPVs)和顆粒體病毒屬(granulosis viruses，簡稱GVs)。NPV所形成的封埋體稱之多角體(polyhedra)，大小約1-10 μ m，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120-300×300-500 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，並被認爲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，於昆蟲中腸內强鹼環境下(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，所產生的病毒稱之爲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基因開始啓動，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，可見其基因具有强勢之啓動子。此外p10蛋白在末期亦爲顯著的病毒蛋白。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殖入質體 (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 GVs 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：加州苜蓿尺蠖蛾 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爲 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 會議中賦于桿狀病毒可作爲殺蟲劑使用的權力[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爲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，可視爲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 (Z_2-75) 之致病力高於其他 8 株[4]。將台灣分離株 (TWN-1) 與 (Z_2-75) 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爲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 $TCID_{50}$/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 LD_{50} (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，以作爲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 liturae*) 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)。因此以桿狀病毒作爲殺蟲劑時，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) 切除後殖入可作爲多重限制酶切割之多選殖區 (multiple cloning region)，只留下基因之5' 啓動子區及 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]。截自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啓動子，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 重組病毒爲供試病毒，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爲指標。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爲可行，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。進一步認爲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强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。其目的即是在能增强致病力、縮短殺蟲時間或至少能減少爲害的程度。

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,* tabacco 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*) 表皮蛋白之分泌胜肽轉譯序列，以促進病毒感染的細胞合成之 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 viresceus*) 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醣醯轉化胺 (virus gene-eucoded 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爲桿狀病毒殺蟲劑，但無論如何這方面的研究還是鼓舞了昆蟲基因可作爲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 量和增强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 thuringinesis* δ -endotoxin)

蘇力菌 δ -內毒素爲 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。目前已被大量用以作爲殺蟲劑，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爲是安全的。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]，其因素可能爲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

蠕 (*Pyemotes tritia*) 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，分子量大小爲 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。具多角體型式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]。

北美蠍 (*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 的信息胜肽轉譯序列加入其 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

作爲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爲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) 加强流行病學的研究；(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、龍燦新、甘才光、劉复生、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 lopper, *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 juvenil 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 carring 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. Podgewait, 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 fammily and groups-baculoviridae, pp. 117-131. In R. I. B. Francki, C. M. Fauguet, 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.

「植物保護新科技研討會」專刊
臺灣省農業試驗所特刊第57號 pp. 203-206 (1996)

綜合討論

主 持 人：古德業、陳秋男、杜金池、范國洋、林俊義、朱耀沂、蘇鴻基

中心議題：生物技術在植物保護未來之發展潛力

1. 對病蟲害防治之應用前景如何？
2. 試驗研究單位和學校如何分工配合加速發展？
3. 經費預算及行政方面如何配合？

林所長俊義致詞：

本人陪同邱廳長到法國、德國簽屬合作計畫，也參觀法國的國家農業科學研究院，該院非常注重縱的及橫的聯繫，其下所屬的22個分所包括畜牧及各方面，均以一個重要的題目，結合各方面的人才在一個大的計畫下，通力合作，而不是零星分散的，任由各個研究人員，執行不同的小計畫。所與所之間也常針對不同的題目，進行交流研討，例如，電腦方面或基礎研究。因此他們的研究成果，均較廣泛且周延。將來在我國的學術研究如何分工合作的問題，值得借鏡。

如何利用生物技術加強植物保護的工作，本人已擬出一些重要方向，但內容仍須由各位專家來決定與支持。農委會在過去就相當重視這個議題，將來農林廳也會加強。

10月22日農業試驗所百周年慶典的活動內容，包括展示會、田間的觀摩，我僅代表農試所邀請各位蒞臨指導，並感謝農委會及農林廳的支持，才能舉辦這個研討會，預祝各位研究順利，身體健康。

沈副所長再發致詞：

一個新的品種，無論是最新的生物技術的產物或傳統育種的結晶，從研究開發到推廣繁殖的各各層面，都需要有不同層級的研究試驗單位的協助配合，方能竟盡全功。農業試驗所及亞蔬中心在農委會的支持下，已成立國家基因轉殖溫室。因此，請各位學術研究人員及單位，在需要利用此設備時，隨時與本所或亞蔬中心連絡，自當盡力協助配合。

王清玲發言:

實驗研究單位與行政單位的互相溝通方面可能需要加強，因雙方的瞭解可能有些差距。比方說粉蝨的問題，在歐洲方面用生物防治方法所防治的粉蝨是溫室粉蝨，台灣溫室粉蝨則很少，最近在本省發生最多的粉蝨是銀葉粉蝨，是最近才產生的一個抗藥品系，全世界的研究都很少。而我們台灣可說是已經趕得上世界研究的腳步，不管是在新引進寄生蜂或本地寄生蜂，物理防治或藥劑篩選方面都有可以拿出來的東西。

至於後龍或花蓮發生的問題，因爲我們是第一線，其實我們比廳裏更早到現場看過樣品。但是可能廳裏不瞭解我們的情形、而且我們不瞭解廳裏希望我們做什麼。所以我希望在實際的保護

工作進行的時候，雙方能有更進一步的瞭解與溝通。

我也瞭解行政單位對於試驗研究單位的期望，可能是恨鐵不成鋼，所以常是苛責多於鼓勵。所以我希望行政單位能多一點精神支持、我們也盡量的與行政單位配合，大家共同努力解決問題。

羅幹成發言:

草蛉之利用技術是農業試驗所發展出來的，但目前都由推廣單位主導、似乎兩三年前之技術已經夠用了。實際上本所在此方面不斷有技術改進，最近據說將就草蛉作大面積之推廣，但農試所居然都不知道，好像我們已經不需要了，推廣單位技術已經足夠了，研發單位與推廣行政單位之組合確屬極爲重要，但似乎並未獲得注意。

高穗生發言:

遺傳工程產品管理法規之訂定和風險評估方法之建議，實爲當務之急。應於最近的將來由主管機關儘速召開公聽會，集思廣議、妥善研擬、未雨綢繆以爲因應。蟲生病原微生物資源調查應繼續加强及加速開發本土微生物殺蟲劑，減少化學農藥之使用。

鄭　允發言:

農林廳或農委會應先建立應用研究之可行性評估。譬如、某個應用研究很有潛力，而且研究人員做的很辛苦，因此上級單位在經費分配及行政管理的評估上，應事先研究清楚。工作的劃分應明確，何者做研究工作、何者做推廣工作、二者如何分工合作。如此不管是研究單位或推廣單位都不會有怨言。

陳科長秋男致詞：

實際上農委會對於所有的應用研究計畫都有做評估的工作；該推廣的工作本會與農林廳一定全力推廣。

吳信淦發言:

生物技術如何應用於植物保護的工作，譬如說將需要找到基因，轉殖到作物上面，是最終的手段。但在這之前，則必需先去找到這個基因，如何找到這個基因，用分子標記是最好的方法。稻熱病目前尚未從這個方向研究，我建議現在應可以朝這個方向開始，以我的瞭解，農試所植病系已有很優秀的年輕人有能力做這方面的研究，因此這是一個非常好的時機。

建議考慮將生物技術開始應用於臺灣抗稻熱病育種，而首先要做的是，調查本地稻熱病菌分佈的情形，以充分瞭解臺灣各種抗稻熱病菌小種的分布，再針對此分布情形，來做臺灣稻熱病抗病育種的工作，其次利用分子標記的方法，找出各小種的抗病基因，如利用RAPD的方法，當找到基因後，再利用目前已知的二種稻的基因轉殖方法，育成新的抗病品種。因此以目前來看正值一個美好的遠景。

范科長國洋致詞：

現階段的植物保護，農藥的使用量逐漸減少，但有一些農作物的品質仍有待提升，農藥的殘毒也必須加强管制。或許以前我們沒有做，現在做了，才發現這個問題，或是過去也有這個情況，而現在做多了，才發現問題嚴重。所以現在的生物技術不是前景如何的問題，而是前途無量，也是今後必須要做的。

事實上我們廳裏，對於各試驗研究人員所推出的，可推廣的研究都全力支持的在推廣。就是希望給大眾知道政府對於減少農藥使用量有盡一份力量。如玉米的寄生蜂、性費洛蒙、紅豆拮抗菌，呂博士提的有機質肥料，現在正準備大量推廣的草蛉在木瓜上的防治，及其他的園藝作物的害蟲上。但目前植物保護的問題相當多，而許多研究人員的生物技術的研究並不能與實際的問題相結合，不能解決目前迫切需要的。當然也有一些研究人員的成果很好，如葉錫東教授的木瓜將來很有潛力。但總合來說，目前的研究成果不敷實際需要，仍舊嫌少。所以我希望將來發展生物技術的時候以能解決目前問題的技術爲優先。

最近花蓮新城及苗栗後龍的花椰菜的粉蝨均大發生，需要農林廳的緊急支援；粉蝨的防治在國外雖已經有商品化的天敵可供農民使用。但目前我們連藥劑防治的方法，都沒有更遑論用天敵防治粉蝨。因此生物技術的發展，當然需要支持，但需要針對目前的問題先解決，這樣才能讓農民知道，我們政府每年都有新的技術推出，每年都在成長。謝謝各位。

呂理燊發言：

我想生物技術是一個很新的範疇，也包括一些舊的東西，如有機質肥料，多年來，在果樹病害方面的觀察，我覺得有機質對病害防治有很大的貢獻。對農民來講，它不只是對病害防治的貢獻，同時是對產量與品質的貢獻。所以農民很樂意採用一些好的有機肥料。我要强調的是，目前果樹有很多根部病害，褐根病、根腐病等，這些都是藥劑很難防治，我們也不希望用藥劑，近年來都是推廣使用幾丁質與有機質混合肥料來用，但在學術上，如營養問題，如何添加土壤肥料劑，營養及病理二方面的學者如何配合研究，因此學術與實用存在著一個很大的距離，我想恐怕不只果樹，如黃振文教授所開發出來很好的農業廢棄物，也是有機質的東西，當然他那方面的研究較多。我想這是將來一個對土壤病害相當有效的方法。

我想有機質的利用不只是可用在地下部的病害，連地上部的病害也有用，例如：桃的流膠病、梨的輪紋病、嚴重時全株枯死，但觀察發現，只要種在土地肥沃、管理較好的地方，這二個病害都比較沒有問題。這是否與作物的抵抗力有關，但這方面的研究則付之闕如。

整個國家的政策，應好好的証明有機質對於作物的病害的預防，或生物防治的研究應多加支持，才能眞正的減少農藥的使用，對農民有益。

蘇鴻基致詞：

生物技術在植物病理應用上有美好的前景。例如桔柑黃龍病的〝健康株檢定〞，傳統的方法無法突破，只有用生物技術方法，才能突破。香蕉萎縮病及木瓜輪點病已利用基因轉殖來產生抗病品種。利用cell culture來大量生產健康菌。

王重雄發言：

目前蟲生病原菌之研究仍非常欠缺，到目前爲止，蟲生病原菌資源的開發在台灣做的很少；在眞菌方面，如劉顯達、曾顯雄教授，BT方面有高穗生，其他的病毒及線蟲方面則沒有人做，實在很可惜。假如我們做好病毒的資源調查，就可以從中篩選出有用的生物防治材料。另外我建議要建立國家養蟲室，如將來要生產外源蛋白質或是做爲一個農藥的生物測定，都需要有健康的蟲子，因此急需設立。另外也急需要研究早期診斷技術之開發，包括病原體及害蟲；細胞株及病毒體外培養系統之建立；蟲生病原病毒基因之研究，尤其表現具體之應用寄生區域之研究；及生物防治用病毒之大量生產。

附錄一、研討會籌備委員及工作人員一覽表

籌備委員及工作人員：

一、召 集 人：杜金池、林俊義、朱耀沂

二、籌備委員：陳科長秋男、范科長國洋、吳主任文希、謝主任文瑞
蘇主任宗宏、張主任念台、蔣主任慕琰、羅主任幹成
彭主任金騰、鄭博士允

三、執行祕書：羅幹成、彭金騰

四、總 幹 事：陳健忠、楊宏仁

五、秘 書 組：張義璋（組長），王清玲（副組長）

六、議 程 組：方尚仁（組長），鄧汀欽（副組長）
張淑貞、陳殿義、許秀惠、王貴美、李啓陽、蔡志濃

七、總 務 組：謝廷芳（組長），姚美吉（副組長）
陳文華、余志儒、吳寬澤、陳金枝

八、接 待 組：高靜華（組長），楊一郎（副組長）
林鳳琪、謝麗娟、廖英明

九、學 術 組：羅朝村（組長），周樑鎰（副組長）

植物保護新科技研討會專刊

發行人：林 俊 義

編　輯：羅朝村、周樑鎰

出版者：臺灣省農業試驗所

地址/臺中縣霧峰鄉中正路189號

電話/(04) 330-2301

電傳/(04) 333-8162, 330-2806

承印者：寶成電腦文字排版坊

地址/ 臺中市建成路300號

電話/(04) 213-0862

電傳/(04) 211-1655

中 華 民 國 八十五 年 六 月出版

非 賣 品

ISBN 957-00-7487-6

統一編號
030856850078

ISBN 957-00-7487-6