



The Characterization of *Lymantria xyloina* Nucleopolyhedrovirus (LyxyNPV) and the Establishment of in vitro Multiplication of LyxyNPV 【Research report】

黑角舞蛾核多角體病毒之特性及體外增殖系統之建立【研究報告】

Chen-Chung Yu, Hwie-Hsin Kao and Chung-Hsiung Wang*1)、Jung-Tai Chao and Sheng-Shan Lu 2)
猶建中、高懷心、王重雄*1)、趙榮台、陸聲山2)

*通訊作者E-mail :

Received: 1996/01/11 Accepted: 1996/01/11 Available online: 1997/03/01

Abstract

The casuarina moth, *Lymantria xyloina*, is an important pest of broadleaf trees in Taiwan. The viral pathogen, *L. xyloina* nucleopolyhedrovirus (LyxyNPV), was isolated and purified from the moribund larvae with nucleopolyhedrosis. The morphological and biochemical characteristics and in vitro multiplication of LyxyNPV were studied. LyxyNPV is a typical NPV with an envelope and rod shape. IPLB-LD652Y cells are highly susceptible to this virus and the infected cells show a polyhedral symptom in their nuclei. The major protein patterns of LyxyNPV and LdNPV (*L. dispar* NPV) are similar except for a 42.6kDa band in the former and a 44.5kDa band in the latter. However, the EcoRI restriction enzyme profile of LyxyNPV exhibits a significant difference from that of LdNPV. Based on the in vitro host range and also morphological and biochemical characteristics, LyxyNPV is considered to be closely related to LdNPV.

摘要

黑角舞蛾(*Lymantria xyloina*)是近年來危害台灣防風林之主要害蟲，由其罹患核多角體(Nucleopolyhedrosis)之幼蟲所分離出黑角舞蛾核多角體病毒 (*L. xyloina* nucleo-polyhedrovirus, LyxyNPV) 進行形態及生化特性等資料以及體外增殖系統之建立。黑角舞蛾核多角體病毒之病毒粒子屬典型之核多角體病毒，其被膜呈桿狀。體外增殖系統已成功地建立，只有IPLB-LD652Y細胞株能接受此病毒並呈多角體症病變。黑角舞蛾核多角體病毒之包涵體的主要蛋白質圖譜與舞毒蛾(*L. dispar* nucleopolyhedrovirus;LdNPV)極為相似，不同處在於42.6 kDa和44.5 kDa蛋白質帶分別只存在於LyxyNPV和LdNPV。至於基因組之EcoRI限制切割圖譜，與已報導之舞毒蛾核多角體病毒之EcoRI限制切割圖譜有相當多的差異。基於體外感染寄主域和特性的鑑定上認為兩種舞蛾核多角體病毒親緣關係是相當接近。

Key words: *Lymantria xyloina*, LyxyNPV, in vitro multiplication, characteristics

關鍵詞: 黑角舞蛾、黑角舞蛾核多角體病毒、體外增殖、特性。

Full Text: [PDF\(15.05 MB \)](#)

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

黑角舞蛾核多角體病毒之特性及體外增殖系統之建立

猶建中 高懷心 王重雄 * 國立台灣大學植物病蟲害學系 台北市羅斯福路四段 1 號
趙榮台 陸聲山 臺灣省林業試驗所森林保護系

摘要

黑角舞蛾 (*Lymantria xylosteana*) 是近年來危害台灣防風林之主要害蟲，由其罹患核多角體 (Nucleopolyhedrosis) 之幼蟲所分離出黑角舞蛾核多角體病毒 (*L. xylosteana* nucleopolyhedrovirus, LyxyNPV) 進行形態及生化特性等資料以及體外增殖系統之建立。黑角舞蛾核多角體病毒之病毒粒子屬典型之核多角體病毒，具被膜呈桿狀。體外增殖系統已成功地建立，只有 IPLB-LD652Y 細胞株能接受此病毒並呈多角體症病變。黑角舞蛾核多角體病毒之包涵體的主要蛋白質圖譜與舞毒蛾 (*L. dispar* nucleopolyhedrovirus; LdNPV) 極為相似，不同處在於 42.6 kDa 和 44.5 kDa 蛋白質帶分別只存在於 LyxyNPV 和 LdNPV。至於基因組之 EcoRI 限制 切割圖譜，與已報導之舞毒蛾核多角體病毒之 EcoRI 限制 切割圖譜有相當多的差異。基於體外感染寄主域和特性的鑑定上認為兩種舞蛾核多角體病毒親緣關係是相當接近。

關鍵詞：黑角舞蛾、黑角舞蛾核多角體病毒、體外增殖、特性

前言

黑角舞蛾 (*Lymantria xylosteana* Swinhoe) 又稱木毒蛾，分佈於台灣、日本、印度及大陸福建、廣東等地，屬於雜食性森林害蟲，為害林木甚鉅外，亦有為害果樹之記錄。台灣於 1903 年首次記錄此蛾的存在，當時此蛾屬於非常見之昆蟲 (Matsumura, 1933)。

根據 1991 年在大陸福建、廣東等地之調查其寄主植物達 21 科 38 種 (Xia, 1991)，近年來在台灣調查的結果發現至少多達 29 科 63 種，寄主植物全皆屬闊葉樹種，其中有 9 種為果樹，台灣此蛾之大發生記錄有 1928 及 1935、1983、1984、1995、1996 年 (Chang and Weng, 1985; Chao et al., 1996)。由此可見此蛾之寄主植物譜有逐年

擴增，為害頻度漸繁及為害地區漸廣的現象。雖然此蛾每年皆有區域性為害報導，然而未受到相當的重視，主要因素在於此蛾的發生時間短（3月中旬至7月），一年一世代，易為人所淡忘。但見此蛾為害的樹種及面積有不斷擴增的趨勢，再加上雌蛾繁殖力強，因此為未雨綢繆，對此蛾的基本生物學的研究是不容忽視，對此蛾的防治亦是刻不容緩。

黑角舞蛾屬毒蛾科（*Lymantriidae*），舞蛾屬（*Lymantria*），同屬之另一種類舞毒蛾（*L. dispar* L.）又稱吉普賽舞蛾，是世界性重要森林害蟲，尤其為害歐美森林由來已久，對舞毒蛾的基本生物學及防治方法，已累積了相當多的經驗，並有專書的印製（Nealis and Erb, 1993）。有關防治的方法乃採用綜合防治法，其中值得一提的是利用其病毒病原體－舞毒蛾核多角體病毒（*L. dispar* nucleopolyhedrovirus; LdNPV）防治並可抑制大發生的發生。此病毒已被大量生產並商品化，其商品名稱為 Gypchek (Wood and Granados, 1991)。黑角舞蛾與舞毒蛾屬相近種類，大陸已發現有罹患核多角病（nucleopolyhedrosis）的黑角舞蛾的個體（Xia, 1991），其病原體並經證實是屬桿狀病毒科（Baculoviridae）之核多角體病毒（NPV），並命名為黑角舞蛾核多角體病毒（*L. xylosteana* NPV; LyxyNPV）(Liang et al., 1986)。1996年5月採自台灣北部北投地區泡桐（*Paulownia fortunei*）樹上之黑角舞蛾幼蟲中，罹患核多角體病的蟲體之比例甚高（約50% ~ 60%，未發表資料），可見此病毒已確實存在台灣的黑角舞蛾族群中。若師法歐美學者之使用舞毒蛾核多角體病毒作為有效的微生物殺蟲劑，則防治成果是可預期的。目前對此病毒的特性，大量增殖以及應用研究皆均闕如，所以建立黑角舞

蛾及其核多角體病毒之基本資料是有其必要性。然而黑角舞蛾如前述發生時間短，故對研究所需之素材來源限制頗多，如中止卵休眠，人工飼育等是待突破的瓶頸。相同地，其病毒病原體的取得來源亦是研究上最大的問題。本文主要的研究重點除確定黑角舞蛾核多角體病毒的特性外，並與舞毒蛾核多角體病毒作類比，建立體外增殖系統，以作為將來大量生產以及篩選高致病性病毒株，以為將來防治之用。

材料與方法

一、供試昆蟲及病毒來源

3 ~ 6 歲之黑角舞蛾幼蟲於 5 月中旬採集自台北近郊之野生族群，以泡桐葉飼養於實驗室。黑角舞蛾核多角體病毒乃自野外罹病之黑角舞蛾幼蟲蟲體以及採回實驗室內飼養之罹病幼蟲蟲體中分離而得。

舞毒蛾核多角體病毒係由 John P. Burand 博士 (Departments of Microbiology and Entomology, University of Massachusetts) 所贈 (由殷之銘教授代轉)。

榕樹透翅毒蛾核多角體病毒 (*Perina nuda* NPV; PenuNPV) 及苜蓿尺蠖蛾核多角體病毒台灣株 (*Autographa californica* NPV-Taiwan 4; AcNPV-TWN4)，係分別由本實驗室自罹核多角體病毒病之榕樹透翅毒蛾幼蟲及甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) 幼蟲分離而得。

二、包涵體和病毒之純化及病毒形態之觀察

包涵體和病毒之純化方法依照 Wang et al. (1996) 所發表的方法，簡述如下：

取罹病之蟲體，加入適量的二次蒸餾水加以研磨後，用每平方英寸 150 網孔的銅網加以過濾，再將濾液置於離心管中，以 4,500 rpm (Hettich Universal 30F/RF)，

於 4 °C 下離心 30 分鐘將包涵體沉澱，倒除上清液。將沉澱之包涵體以 3 倍體積的二次蒸餾水使其再懸浮，再加入等體積的正己烷 (n-hexane)，將其混合均勻之後以 1,500 xg，4 °C 下離心 30 分鐘後，將沉澱之包涵體以二次蒸餾水使其再懸浮。將此懸浮液利用 40% ~ 65% 的蔗糖重量百分濃度連續密度梯度離心 (continuous sucrose gradient centrifugation)，以 74,000 xg，4 °C 下離心 30 分鐘，可在蔗糖濃度約為 55% 處收集包涵體聚集的白色環帶，再加入二次蒸餾水稀釋三倍後以 4,500 rpm，於 4 °C 下離心 30 分鐘後，倒除上清液，即可得到純化之包涵體，將其存於 4 °C 或 -20 °C 備用。

取經蔗糖重量百分濃度連續密度梯度離心純化的包涵體，加入適量的 3X DAS (0.3M Na₂CO₃, 0.51M NaCl, 0.03M EDTA·4Na, pH = 10.9) 溶液，經劇烈振盪數分鐘後，於顯微鏡下鏡檢，直至包涵體完全溶解後，用 40%~65% 的蔗糖重量百分濃度連續密度梯度離心，以 74,000 xg，4 °C 下離心 1 小時，可看見數條白色的核多角體病毒粒子之聚集帶，將其收集後再以 3 倍體積的 TE 緩衝液稀釋，再以 74,000 xg，4 °C 下離心 30 分鐘，將病毒粒子沉澱，倒去上清液後再以少量的 TE 緩衝液使病毒粒子再懸浮，將其存於 4 °C 備用。

將純化之病毒粒子以 2% 磷鎢酸 (phosphotungstic acid) 水溶液作負染色法 (negative stain) 處理，再置於穿透式電子顯微鏡 (Hitachi H 7100) 下觀察照像。

三、細胞培養與病毒體外增殖

(一) 細胞培養

舞毒蛾細胞株 (IPLB-LD652Y)，數種夜蛾細胞株 (IPLB-SF 21AE、UCR-SE 1 及 NTU-SL 7B) 和榕樹透翅毒蛾細胞株 (NTU-PNHH) 等，均培養於含 8 % 胎牛血

清 (Fetal calf serum, FCS; Seralab) 之 TMN-FH 培養液 (Gibco) 中，每隔 3 至 4 天繼代培養一次，並於 28 °C 之恆溫箱中培養。

(二) 病毒增殖

將 3×10^6 的 IPLB-SF21AE 及 NTU-PNHH 細胞，分別接種於 25T 培養皿中，待細胞貼附約 1 至 2 小時後，吸出培養液，分別加入適量的 AcNPV-TWN4 及 PenuNPV 病毒液，吸附 1 小時後，吸出病毒液，加入 5 ml 新鮮培養液，置於 28 °C 之恆溫箱中培養。約 7 天後以橡皮刮勺 (rubber policeman) 將細胞刮下，吸取並集中於離心管中，以 2,500 rpm 離心 30 分鐘，收集上層懸浮液作為再感染之用。

(三) 黑角舞蛾核多角體病毒之體外增殖及體外寄主範圍

取 25 隻罹核多角體病之幼蟲，分別於生理食鹽水內將之研磨過濾，方法如前述。再經 2,500 rpm，30 分鐘離心之後，分別以 0.45 μm 孔徑之針頭過濾器過濾，以除去細菌之污染，再將過濾液 1 ml 加入對數期之毒舞蛾細胞株培養皿內，吸附 1 小時之後，更換新鮮培養液 4.5 ml。以每星期為一周期，每周期將感染細胞及培養液收集，並經 2,500 rpm，30 分鐘離心後，再取上清液感染新的對數期毒舞蛾細胞株。經五周期後，將 1 ml 感染液，依照 Chou *et al.* (1996) 之報告，萃取病毒 DNA 並進行 PCR 偵測病毒之存在，以確定是否需要繼續繼代增殖。凡 PCR 偵測正反應之病毒液持續繼代增殖，直到細胞病變有包涵體產生為止，並將各病毒液儲存於 4 °C，以備往後之用。

選擇產生細胞病變快且高感染率之病毒株命名為 LyxyNPV-1，取其病毒液依上述之方法感染其它鱗翅目細胞株 (IPLB-SF 21AE、IPLB-SE 1、NTU-SL 7B、和

NTU-PNHH 等），感染後 1 星期內每日觀察記錄細胞病變現象。

四、包涵體蛋白質之分析

(一) 包涵體蛋白質之製作

根據 Reinganum (1984) 之方法，簡述如下：

取適量經蔗糖連續密度梯度離心純化的包涵體，加入 895 μl 含有 0.05 M Tris-EDTA 及 100 μl 的 10% SDS 和 5 μl 的 β -mercaptoethanol 的溶液，充份混勻後於 70 °C 水浴 30 分鐘，然後以 1,500 rpm (KUBOTA 1300) 在 4 °C 下離心 10 分鐘，倒去上清液後再加入 500 μl 的二次蒸餾水充份混勻，再以 1,500 rpm 在 4 °C 下離心 10 分鐘，倒去上清液後再加入 250 μl 的 2X 標本緩衝液 (250 mM Tris HCl, 4 mM EDTA-2Na, 4 g SDS, 10 μl β -mercaptoethanol, 0.01 g bromophenol blue) 及 250 μl 的二次蒸餾水，充份混勻後在 100 °C 下水浴 15 分鐘，而後以 11,000 rpm 在 4 °C 下離心 10 分鐘，取上清液存於 -20 °C 以備電泳之用。

製作不連續性之 SDS-聚丙醯胺膠片 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)，以濃度 12.5% 為分離膠片 (separating gel)，濃度 2.5% 為集體膠片 (stacking gel)，將製備好的樣本加適當體積於膠片模型中，通以 100 伏特的電流約 2 小時，電泳完成後，膠片以銀染法呈色。

(二) 銀染法膠片染色

根據 Juang and Su (1987) 之方法，簡述如下：

將完成電泳之膠片以 50% 的甲醇溶液洗 3 次，每次約 10 分鐘，而後倒去甲醇溶液，加入二次蒸餾水清洗膠片，再以還原液甲 (每公升含 5 ml 之 25% glutaraldehyde, 5 g 之 sodium thiosulfate) 反應 1

小時後，倒去還原液甲，用二次蒸餾水清洗 4 次，每次約 10 分鐘，再加入硝酸銀溶液 (每公升含 8 g silver nitrate, 210 ml 之 0.36% NaOH, 14 ml 之 NH₄OH) 反應 10 分鐘，倒去硝酸銀溶液再用二次蒸餾水清洗 4 次，每次約 10 分鐘，再加入還原液乙 (每公升含 10 ml 之 0.5% citric acid, 1 ml 之 formaldehyde, 150 ml 之 methanol) 反應，色帶應於 10 分鐘內出現，倒去還原液乙再用二次蒸餾水清洗 1 次後，加入反應中止液 (每公升含 100 ml 之 0.5% citric acid, 1 ml 之 methylamine) 中止呈色反應，浸泡反應中止液 1 小時後，將膠片置於 50% 甲醇溶液中 30 分鐘，再以浸水 15 分鐘的濕玻璃紙封片 1-2 天，乾燥後即可將膠片保存。

五、核多角體病毒 DNA 分析

(一) DNA 之純化

取已純化的 LyxyNPV 與 PenuNPV 之核多角體病毒，加入 1/10 體積的 10% SLS 及 1/10 體積的 1 M KCl 和 1/10 體積的 proteinase K (5 mg/ml)，於 65 °C 水浴作用 3 小時以上，再加入 1 倍體積的酚 (phenol) 與 DNA 充份混合，以 1,500 rpm (KUBOTA 1300) 在 4 °C 下離心 5 分鐘，吸掉下層液，加入 2 倍體積的氯仿 (chloroform)，充份混合後以 2,000 rpm 在 4 °C 下離心 5 分鐘，吸取上層液到另一離心管中，加入 1/10 體積的 3 M sodium acetate (NaOAc) 和 2 倍體積的絕對酒精，充份混勻後放入 -70 °C 冰箱 30 分鐘，取出後以 12,000 rpm 在 4 °C 下離心 30 分鐘，將 DNA 沉澱下來，倒去上清液，加入 70% 的酒精浸潤並馬上倒去，再加入絕對酒精除去水份，倒去酒精後放入 55 °C 的烘箱將 DNA 烘乾。自烘箱取出後加入適量的 TE 緩衝液，放入 65 °C 水浴處理 30 分鐘，最後置於

4 °C 或 -20 °C 備用。

(二) DNA 限制冲切割

取已純化的 LyxyNPV 與 PenuNPV 之核多角體病毒 DNA，依照 Promega 公司之使用者手册上所述之方法，利用 EcoRI 限制冲切割後，於 0.75% 的瓊脂膠片 (agarose gel) 進行電泳分析照像。

六、聚合吟鏈鎖反應

(一) 引子對之設計

Primer 35 、 Primer 36 係採用 Chou et al. (1996) 之報導，其序列如下：

primer 35 :

5'-ACY TAY GTG TAC GAC AAC
AAA TAY TAC AAA-3'

primer 36 :

5'-GGY GCG TCK GGY GCA AAY
TCY TTW ACY TTR AA-3'

(二) PCR 溶液的配製

取適量之樣品，分別加入 dNTP 混合液至最終濃度為 0.25 mM 、正負向引子各 1 μ l (0.5 μ g/ μ l) 、 10 μ l 的 reaction buffer (Promega) 及 0.5 μ l Taq DNA polymerase (5 unit/ μ l)，再加二次滅菌水至總體積為 100 μ l，加入適量的白蠟油 (paraffin oil)，進行 PCR (Thermal Station AG-9600, Biotronics Corp, Lowell, Mass. USA) 反應。

(三) PCR 之反應程式

本試驗所使用的 PCR 反應共包括 7 個步驟：(1) 預熱，94 °C，3 分鐘；(2) 變性，94 °C，1 分鐘；(3) 黏合，45 °C，1 分鐘；(4) 延伸，72 °C，3 分鐘；(5) 重複步驟 (2) 至 (4) 共 40 個循環；(6) 最終延長，72 °C，15 分

鐘；(7) 最後保存於 15 °C。取 10 μ l PCR 產物以含溴化乙烷 (ethylene bromide) 之 TAE 緩衝溶液用 1.5% 之瓊脂進行電泳分析。

結 果

一、黑角舞蛾核多角體病毒之形態與體外增殖系統之建立

採自野外之幼蟲共 500 隻，發現約有 50% 的幼蟲在實驗室飼養 1 週內呈核多角體病之病徵，幼蟲有水腫及體色變黑的狀況。經鏡檢確定之後，取 13 隻嚴重感染的幼蟲作體外增殖之用外，其餘收集以作為純化病毒及抽取 DNA 之用。

黑角舞蛾核多角體病毒是典型的核多角體病毒，其包涵體形狀不規則，直徑在 1.18 ~ 1.73 μ m 之間，而病毒粒子呈桿狀，大小為 425 nm X 63 nm (圖一)。

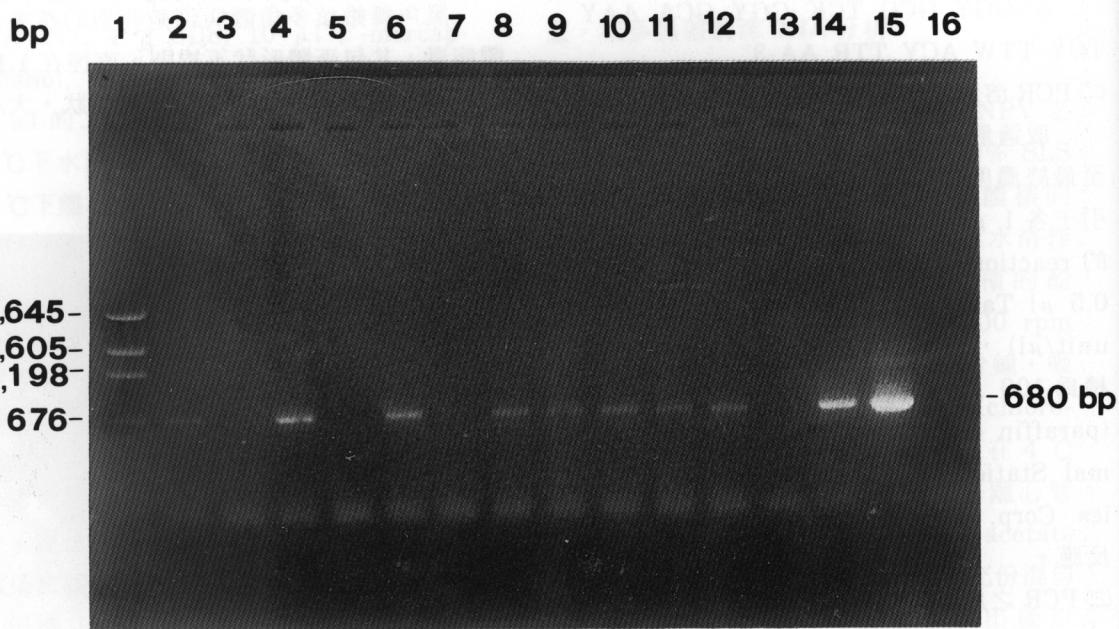


圖一 從罹病幼蟲蟲體純化之黑角舞蛾核多角體病毒之病毒粒子。

Fig. 1. Rod-shaped virions of LyxyNPV purified from polyhedral inclusion bodies from moribund larvae. Bar = 200 nm.

體外感染 IPLB-LD652Y 細胞株之後，經 5 次繼代增殖，雖然於感染後 3 ~ 5 天有些感染之細胞呈核脹大的現象，但未見包涵體的形成，取感染後第七天之培養液，經 PCR 分別測定源自 13 個蟲體之感染液（圖二）中，只有 4 組呈負反應，其餘 9 組再作繼代增殖，於第 8 次繼代增殖後，第 7 與 8 組之感染細胞首先呈現核多角體病之病變，再經 3 次的增殖（11 次）後，包涵體之形成已於感染後第 48 小時可見。另外有 7 組亦於第 10 代之後，陸續呈感染細胞之核多角體病之病變，再經 3 次增殖後，選擇第 3 組之病毒液命名為 LyxyNPV-1，並作體外寄主域之試驗。

LyxyNPV 感染 IPLB-LD652Y 細胞株之後，於感染後 24 小時只可見極少數的細胞（約 0.01%，資料未附）呈核多角體之病變，但可見相同數量的細胞有核脹大的現象；至感染後 36 小時有約 3% 的細胞具有包涵體；至 48 小時呈多角體病變之細胞已達 10%（圖三 A）；至 72 小時（第三天）已有約 50% 的細胞具有包涵體，此時其餘的細胞大部份呈核脹大的現象，細胞偽足銳減；至 84 小時呈多角體病變的細胞達 70%，此時有些細胞開始呈崩解現象；至 96 小時，細胞崩解現象更形嚴重，乃至於培養液充滿細胞碎片（圖三 B）。含多角體病變的細胞，絕大多數屬於寡多角體病變（每個細



圖二 利用聚合鏈鎖反應偵測被黑角舞蛾核多角體病毒所感染之 IPLB-LD652Y 細胞之培養液。

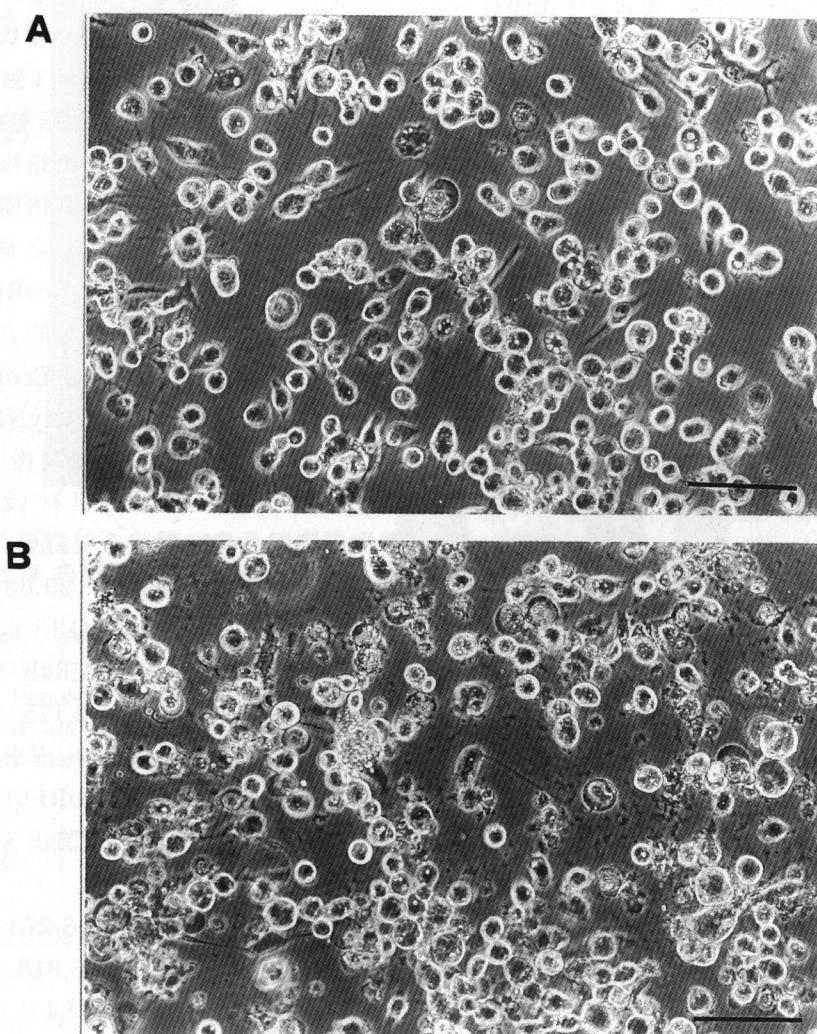
Fig. 2. Detection of LyxyNPV in culture medium of infected IPLB-LD652Y cells by PCR with primers 35 and 36 after the 7th day postinfection. The original viral inoculum was prepared from moribund larvae. The detected medium had been multiplied 5 times in the same cells. Each multiplication interval was 7 days.

Lane 1, pGEM marker; Lane 2-14, DNA purified from the infected media of LyxyNPV; Lane 15, AcNPV DNA for positive control; Lane 16, Buffer for negative control.

胞含多角體個數在 10 個以下；few polyhedra, FP)，只有少數為繁多角體病毒 (multiple polyhedra, MP)。

感染 LyxyNPV 之 IPLB-SF 21AE、UCR-SE 1、NTU-SL 7B 及 NTU-PNHH 細胞皆未呈核多角體之病變，雖然前 3 種細胞有增殖延緩，但未見明顯的胞核脹大的現象。唯有 NTU-PNHH 細胞在感染後除增殖

延緩外，亦有胞核脹大現象，並且在感染後第 5 天開始有細胞崩解發生，此病毒雖然持續於 NTU-PNHH 細胞內增殖 3 代，亦未見呈核多角體之病變，由此結果可確定的是黑角舞蛾核多角體病毒之體外增殖系統已成功地建立，其體外寄主域狹窄，只有 IPLB-LD652Y 能成功地接受此病毒之感染。



圖三 黑角舞蛾核多角體病毒感染 IPLB-LD652Y 細胞後之第三天 (A) 及第五天 (B) 細胞病變。
Fig. 3. Cytopathic effects of LyxyNPV infected IPLB-LD652Y cells after 3rd day (A) and 5th day (B) postinfection. Bar = 0.1 mm.

二、核多角體病毒的蛋白質電泳圖譜

黑角舞蛾包涵體之蛋白質圖譜中，主要的蛋白質帶 (major bands) 有 12 條，其分子量約為 42.6 kDa、30.8 kDa、27.8 kDa、24.7 kDa、23.1 kDa、18.0 kDa、16.5 kDa、15.7 kDa、14.4 kDa、13.4 kDa、12.6 kDa、12.0 kDa；而次要的蛋白質帶 (minor bands) 有 8 條，其分子量

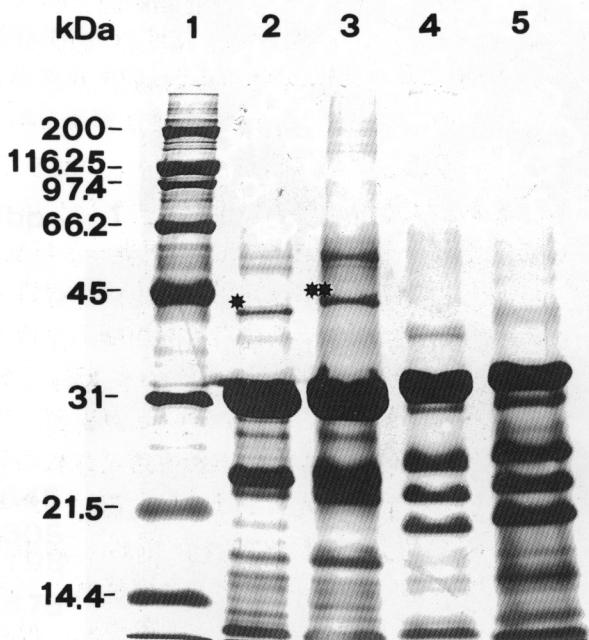
約為 57.2 kDa、54.0 kDa、38.9 kDa、29.2 kDa、26.8 kDa、26.1 kDa、20.5 kDa、18.9 kDa。

比較黑角舞蛾包涵體中的蛋白質圖譜與舞毒蛾包涵體蛋白質圖譜極為相似。明顯可分辨的是只有黑角舞蛾之 42.6 kDa 蛋白質帶，而舞毒蛾亦獨具有 44.5 kDa 蛋白質帶。兩者之圖譜與 AcNPV-TWN4 和

PenuNPV 有極大的不同，而 AcNPV-TWN4 與 PenuNPV 之圖譜較雷同（圖四）。

三、DNA 的限制性核酸內切酶圖譜

將黑角舞蛾核多角體病毒之病毒粒子與榕樹透翅毒蛾核多角體病毒之病毒粒子的 DNA 利用 *Eco*RI 限制性核酸內切酶切割，再用電泳的方式，分析比較其 DNA 被 *Eco*RI 限制性核酸內切酶切割片段。LyxyNPV 之 DNA 被 *Eco*RI 切割後，可鑑識之 DNA 片段共有 12 條，其核酸對 (base pairs, bps) 約為 21,883、20,637、16,647、10,413、7,586、5,889、4,349、3,555、2,645、2,175、1,757 及 1,402 bps。而 PenuNPV 之 DNA 被 *Eco*RI 切割後，有 11 個片段可鑑識出，其核酸對約為 21,634、20,263、18,517、16,273、7,129、6,557、6,318、4,576、3,785、2,484 及 1,813 bps。由上述可知 LyxyNPV 與 PenuNPV 之 *Eco*RI 限制性核酸內切酶圖譜差異極大（圖五）。



圖四 黑角舞蛾、舞毒蛾、榕樹透翅毒蛾及苜蓿尺蠖蛾核多角體病毒台灣株等四種核多角體病毒之包涵體蛋白質電泳圖譜。

Fig. 4. Protein profiles of polyhedra of LyxyNPV (lane 2), LdNPV (lane 3), PenuNPV (lane 4), and AcNPV-TWN4 (lane 5) showing the significant differences between the couple LyxyNPV and LdNPV and the couple PenuNPV and AcNPV-TWN4. Most major bands of LyxyNPV are similar to those of LdNPV except 42.6 kDa is only found in LyxyNPV (*) and 44.5 kDa is only in LdNPV (**). Lane 1, Protein standard marker.



圖五 黑角舞蛾核多角體病毒及榕樹透翅毒蛾核多角體病毒之 *Eco*RI 限制圖譜。

Fig. 5. *Eco*RI restriction endonuclease digested patterns of LyxyNPV (lane 2) and PenuNPV (lane 3) DNAs. Lanes 1 and 4 are the λ /Hind III marker and pGEM marker respectively.

討 論

黑角舞蛾與舞毒蛾之核多角體病毒包涵體皆呈多形性，但依大小而言，前者 ($1.18 \sim 1.73 \mu\text{m}$ in diameter) 較後者 ($1.61 \sim 3.65 \mu\text{m}$ in diameter) 為小。至於病毒粒子之差別並不明顯，毒舞蛾包涵體病毒粒子之大小為 $280\text{-}400 \text{ nm} \times 70 \text{ nm}$ (Liang *et al.*, 1986)，但黑角舞蛾核多角體病毒大小

為 $425 \text{ nm} \times 63 \text{ nm}$ ，較前者長且寬。

黑角舞蛾核多角體病毒之體外增殖在感染 IPLB-LD652Y 細胞上獲致成功，此病毒之體外寄主已確定的是對夜蛾科細胞株 (IPLB-SF 21AE、UCR-SE 1 及 NTU-SL 7B) 不具感染作用，雖能延後此三株細胞的生長速度，但感染的細胞之病變並不明顯。然而對同科之 NTU-PNHH 細胞之感染，除有細胞中止生長，胞核脹大外，於感染 5 天後則有細胞崩解發生，雖經於 NTU-PNHH 細胞內增殖 3 次還未見有包涵體之產生，因此 LyxyNPV 感染 NTU-PNHH 細胞雖尚無典型的多角體病變，但可肯定的是 NTU-PNHH 亦是 LyxyNPV 可接受的細胞株，但是否能在此細胞株內呈典型的病變則有待更進一步的繼代感染，或用其它方法如電子顯微鏡之觀察或 PCR 方法作更進一步證實。

從蛋白質電泳圖譜可看出黑角舞蛾和舞毒蛾之包涵體中的蛋白質圖譜極為相似，唯有黑角舞蛾包涵體蛋白之 42.6 kDa 與舞毒蛾的包涵體蛋白之 44.5 kDa 可區別。而黑角舞蛾的包涵體蛋白與榕樹透翅毒蛾的包涵體蛋白差異頗大。就分類地位來看，黑角舞蛾與榕樹透翅毒蛾屬於同科 (毒蛾科, Lymantriidae) 不同屬，而與舞毒蛾為同科同屬 (*Lymantria*)，因此與舞毒蛾之親緣關係較近，而與榕樹透翅毒蛾之親緣關係較遠。相同地，其病源體—核多角體病毒亦呈相同的親緣關係。然而蛋白質圖譜相似並不十分反映親緣關係 (Wang *et al.*, 1996)，譬如苜蓿尺蠖蛾核多角體病毒與榕樹透翅毒蛾核多角體病毒之關係相差甚遠，但其主要蛋白質帶從 38.9 kDa 以下都相似 (圖四)。比較 *Eco*RI 限制沖之圖譜，4 種核多角體病毒差異甚大 (Slavicek *et al.*, 1992; Chou *et al.*, 1996)。因此從限制沖圖譜上著眼分析，黑角舞蛾核多角體病毒與舞毒蛾

核多角體病毒是屬不同的病毒，再從細胞株的接受性上而言，IPLB-LD652Y皆可接受LdNPV、OpNPV (*Orgyia pseudotsugata* NPV)、PenuNPV 和 LyxyNPV (Goodwin *et al.*, 1977; Bradford *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1996) 等 4 種毒蛾之核多角體病毒之感染，但此 4 種病毒對夜蛾科之細胞株則呈不感性，再加上黑角舞蛾核多角體病毒對 NTU-PNHH 具感性但不呈典型核多角體細胞病變，以及蛋白質圖譜之結果，我們認為黑角舞蛾核多角體病毒是舞毒蛾核多角體病毒之一種變異株。另外，本省黑角舞蛾發生季節、氣候及溫度條件等 (Chang and Weng, 1985; Chao *et al.*, 1996) 有異於舞毒蛾於北美及加拿大之發生季節 (Nealis and Erb, 1993)，以及台灣並未有舞毒蛾大發生的記錄，因此黑角舞蛾核多角體病毒若源自舞毒蛾核多角體病毒，必然是一種較適應亞熱帶氣候之變異株。依初步的感染試驗(未發表資料)，黑角舞蛾亦可接受舞毒蛾核多角體病毒的感染，至於接受的程度有待進一步的研究，但若欲深入研究此病毒及黑角舞蛾，必然一定要從寄主的基本生物學研究著手，如打破卵休眠，人工飼料發展及大量飼養，如此才能更進一步了解此病原體與其寄主之關係，以及大量生產包涵體的可能性。

誌謝

本論文承國科會 NSC 86-2815-C-002-086-B 及農委會 85 科技-1.1-糧-49 經費補助，試驗中承國立台灣大學植物病蟲害學系吳文哲教授提供相當多的資料及意見，美國麻薩諸賽大學 (University of Massachusetts) 微生物及昆蟲學系教授殷之銘代轉 John P. Burand 教授贈送之舞毒蛾核多

角體病毒篩選株，使本論文得以順利完成，謹此申謝。

參考文獻

- Bradford, M. B., G. W. Blissard, and G. F. Rohrmann.** 1990. Characterization of the infection cycle of the *Orgyia pseudosugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus in *Lymantria dispar* cells. *J. Gen. Virol.* 71: 284-286.
- Chang, Y. C., and Y. C. Weng.** 1985. Morphology, life habit, outbreak and control of casuarina tussock moth (*Lymantria xylosteana* Swinhoe). *Quart. J. Chinese For.* 18: 29-36. (in Chinese)
- Chao, J. T., P. W. Schaefer, Y. B. Fan, and S. S. Lu.** 1996. Host plants and infestation of casuarina moth *Lymantria xylosteana* (Lepidoptera: Lymantriidae) in Taiwan. *Quart. J. Chinese For.* 11: 23-28. (in Chinese)
- Chou, C. M., C. J. Huang, C. F. Lo, G. H. Kou, and C. H. Wang.** 1996. Characterization of *Perina nuda* nucleopolyhedrovirus (PenuNPV) polyhedrin gene. *J. Invertebr. Pathol.* 67: 259-266.
- Goodwin, R. H., G. H. Tompkins, and P. McCawley.** 1977. Gypsy moth cell lines divergent in viral susceptibility. I. Culture and identification. *In Vitro* 14: 485-493.
- Juang R. H., and J. C. Su.** 1987. Polyacrylamide gel electrophoresis of

- protein. Symposium series No. 9: 69-84.(in Chinese)
- Liang, D. R., Y. N. Cai, D. Y. Liu, and Q. L. Zhang.** 1986. The atlas of insect viruses of Hunan. Science Technology Publishing House. pp. 196.(in Chinese)
- Matsumura, S.** 1933. Lymantriidae of Japan-Empire. Ins. Matsum. 7: 111-152.
- Nealis, V. G., and S. Erb.** 1993. A sourcebook for management of the gypsy moth. Ministry of Nature Resources, Forestry Canada. pp. 47.
- Reinganum, C.** 1984. Polyacrylamide gel electrophoresis of baculovirus proteins: a simplified and sensitive modification for differentiating between isolates. J. Invertebr. Pathol. 44: 134-139.
- Slavicek, J. M., J. Podguate, and L. H. Carita.** 1992. Properties of two *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus isolates obtained from the microbial pesticide Gypchek. J. Invertebr. Pathol. 59: 142-148.
- Wang, C. H., C. M. Chou, H. C. Liu, S. L. Kau, G. H. Kou, and C. F. Lo.** 1996. Continuous cell line from pupal ovary of *Perina nuda* (Lepidoptera: Lymantriidae) that is permissive to nuclear polyhedrosis virus from *P. nuda*. J. Invertebr. Pathol. 67: 199-204.
- Wood, H. A., and R. R. Granados.** 1991. Genetically engineered baculoviruses as agents for pest control. Annu. Rev. Microbiol. 45: 67-87.
- Xia, G. R.** 1991. Forest insects of China. 2nded. China Forestry Publishing House. pp. 1362. (in Chinese)

收件日期：1996年11月29日

接受日期：1997年1月11日

The Characterization of *Lymantria xyloina* Nucleopolyhedrovirus (LyxyNPV) and the Establishment of *in vitro* Multiplication of LyxyNPV.

Chen-Chung Yu, Hwie-Hsin Kao and Chung-Hsiung Wang*

Department of Plant Pathology and Entomology,

National Taiwan University, Taipei, Taiwan, R.O.C.

Jung-Tai Chao and Sheng-Shan Lu

Division of Forest Protection, Taiwan Forestry Research Institute, Taipei, Taiwan,
R.O.C.

ABSTRACT

The casuarina moth, *Lymantria xyloina*, is an important pest of broadleaf trees in Taiwan. The viral pathogen, *L. xyloina* nucleopolyhedrovirus (LyxyNPV), was isolated and purified from the moribund larvae with nucleopolyhedrosis. The morphological and biochemical characteristics and *in vitro* multiplication of LyxyNPV were studied. LyxyNPV is a typical NPV with an envelope and rod shape. IPLB-LD652Y cells are highly susceptible to this virus and the infected cells show a polyhedral symptom in their nuclei. The major protein patterns of LyxyNPV and LdNPV (*L. dispar* NPV) are similar except for a 42.6kDa band in the former and a 44.5kDa band in the latter. However, the EcoRI restriction enzyme profile of LyxyNPV exhibits a significant difference from that of LdNPV. Based on the *in vitro* host range and also morphological and biochemical characteristics, LyxyNPV is considered to be closely related to LdNPV.

Key words: *Lymantria xyloina*, LyxyNPV, *in vitro* multiplication, characteristics