



Formosan Entomologist

Journal Homepage: entsocjournal.yabee.com.tw

Studies on the Infectious Flacherie of *Perina nuda* (Fabricius) **【Research report】**

榕樹透翅毒蛾軟化症病毒之研究 **【研究報告】**

Chung-Hsiung Wang*, Chih-Yu Wu, Wei-Yung Chen and Chih-Wei Chen
王重雄*、吳治宇、陳瑋芸、陳智維

*通訊作者E-mail :

Received: Accepted: 1998/11/11 Available online: 1998/12/01

Abstract

Recently, disease outbreaks had caused mass mortalities of laboratoryreared larvae of the ficus transparent wing moth, *Perina nuda* (Fabricius). Moribund larvae exhibited a syndrome similar to silkworms infected with infectious flacherie virus. Two viruses, *P. nuda* nucleopolyhedrovirus (PenuNPV) and a new picorna-like virus (named PnPV), have been isolated from infected larvae with flacherie disease. Negatively stained preparations showed that the virus exhibits icosahedral symmetry and measures 30 nm in diameter with no envelope and no distinct surface structures. The hemolymph of moribund larvae with flacherie disease is either with or without free polyhedra caused by the infection of PenuNPV. The oral-infection experiments showed that pathogenesis of the picorna-like virus is not obvious, but it may cause a synergistic effect in mortality and decrease the yield of polyhedra in infected *P. nuda* larvae with PenuNPV.

摘要

實驗室飼育之榕樹透翅毒蛾 (*Perina nuda*) 幼蟲發生大量死亡，瀕死幼蟲呈現類似家蠶軟化症 (flacherie) 之病徵。從呈軟症之榕樹透翅毒蛾幼蟲可以分離到兩種病毒，一種是榕樹透翅毒蛾核多角體病毒 (*Perina nuda* nucleopolyhedrovirus, PenuNPV)，另一種是小病毒。在負染法處理之下，此小病毒呈現正二十面體的對稱，直徑約為30nm，不具有被膜 (envelope) 和明顯的表面構造，屬小RNA病毒群種類，命名為PnPV。混合感染PenuNPV之軟化症幼蟲，其血淋巴含有或不含有游離的多角體。經口感染實驗證實小病毒之病原性並不強，但可能對PenuNPV殺蟲而言有協力作用，而對利用幼蟲量產多角體上則有負面的影響。

Key words: *Perina nuda*, flacherie, PenuNPV, insect, picorna-like virus.

關鍵詞: 榕樹透翅毒蛾、軟化症、核多角體病毒、昆蟲、小RNA病毒

Full Text:  [PDF\(10.25 MB\)](#)

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

榕樹透翅毒蛾軟化症病毒之研究

王重雄* 吳治宇 陳瑋芸 陳智維 國立台灣大學昆蟲學系 台北羅斯福路四段1號

摘 要

實驗室飼育之榕樹透翅毒蛾(*Perina nuda*)幼蟲發生大量死亡，瀕死幼蟲呈現類似家蠶軟化症(flacherie)之病徵。從呈軟化症之榕樹透翅毒蛾幼蟲可以分離到兩種病毒，一種是榕樹透翅毒蛾核多角體病毒(*Perina nuda* nucleopolyhedrovirus, PenuNPV)，另一種是小病毒。在負染法處理之下，此小病毒呈現正二十面體的對稱，直徑約為 30 nm，不具有被膜(envelope)和明顯的表面構造，屬小 RNA 病毒群種類，命名為 PnPV。混合感染 PenuNPV 之軟化症幼蟲，其血淋巴含有或不含有游離的多角體。經口感染實驗證實小病毒之病原性並不強，但可能對 PenuNPV 殺蟲而言有協力作用，而對利用幼蟲量產多角體上則有負面的影響。

關鍵詞：榕樹透翅毒蛾、軟化症、核多角體病毒、昆蟲、小 RNA 病毒。

前 言

榕樹透翅毒蛾 *Perina nuda* (Fabricius) 屬毒蛾科 (Lymantriidae) 是台灣春夏季常見的榕樹害蟲。此蛾分佈甚廣，除本省外，大陸江西、廣東和西藏 (Yi, 1969; Chu, 1980; Chao, 1982; Su and Chen, 1985)，日本石垣島、西表島、與那國島 (Inoue, 1982)，斯里蘭卡及印度 (Yi, 1969; Chu, 1980; Chao, 1982) 皆有記錄。榕樹透翅毒蛾之幼蟲只為害榕屬 (*Ficus* spp.) 種類之植物，此蛾之生活史在前篇報導已有詳述 (Wang and Tsai, 1995)。幼蟲於夏季常發生流行疫病，即核多角體病 (Nucleopolyhedrosis)，此病導致幼蟲大量死亡，族群數目銳減，因此在秋冬季節不易尋覓此蟲跡。罹患核多角體病之榕樹透

翅毒蛾幼蟲呈典型的核多角體病徵 (Mazzone, 1985)，如體色改變，行動異常，逐漸失去食慾，最後體內組織液化，全身腫脹以致節間膜露出，表皮脆弱，一觸即破，並流出白色或淡黃色的膿汁狀體液，膿汁內充滿多角體 (polyhedra)。人工感染的幼蟲通常在感染 3 至 4 天後蟲體會呈現病徵，5 至 7 天即死亡 (Wang and Tsai, 1995)。有關榕樹透翅毒蛾核多角體病毒 (*Perina nuda* nucleopolyhedrovirus, PenuNPV) 之研究，已有病毒感染和量產 (Wang and Tasi, 1995)、高接受性細胞株之建立和體外增殖 (Wang *et al.*, 1996)、多角體基因 (Chou *et al.*, 1996)、以及 P10 基因 (Chou *et al.*, 1996) 的報導。本研究肇自實驗室飼育之幼蟲發生大量死亡，大部分罹病死亡之蟲體，其病徵異於核多角體

*抽印本索取及論文聯繫之負責人

病，而罹病幼蟲呈乏力現象，與家蠶(*Bombyx mori*)之軟化症(flacherie)病徵雷同(Matsui *et al.*, 1977)。本報導旨在探討引發榕樹透翅毒蛾之軟化症的主要病原體。

材料與方法

一、供試昆蟲飼養

榕樹透翅毒蛾(*P. nuda*)係採自野外之已交配雌蛾，使其產卵於紙上，待卵孵化後，以新鮮之榕樹嫩葉飼育於溫度 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ，相對濕度 80% ~ 85%，光照 12D:12L 之恆溫箱內。

二、罹病蟲體之檢測

取大量飼育過程中自然發病呈現軟化症病徵之幼蟲 150 隻，利用滅過菌的解剖剪，剪去腹足採血淋巴液 $1 \mu\text{l}$ 後，加入 $49 \mu\text{l}$ 的二次蒸餾水，即稀釋 50 倍，以血球計數器(hemocytometer)檢測。依檢體之血淋巴液所含有多角體的數目，將檢體分成多角體(P)、少多角體(F)、和無多角體(N)三組，供研究所用。

三、病蟲之病理切片觀察

罹病幼蟲初發軟化症病徵時(共取 6 隻：3 隻呈矮化症，3 隻呈下痢症)，即先以 FAA 溶液(70% 乙醇 / 福馬林 / 冰醋酸：20 / 1 / 1)固定 30 分鐘，再將蟲體置於固定液內抽氣 4 至 5 次，爾後繼續於相同的固定液中固定 12 小時，以遞增濃度之乙醇，70%，80%，90%，95% 和 100% (兩次)脫水，每階段脫水 40 分鐘，再以二甲苯兩次置換，每次 40 分鐘。放入約 60°C 恆溫箱進行浸蠟步驟，本實驗所使用的包埋蠟為 paraplant (MONOJECT 溶點 56°C)，蟲體經兩次溶蠟浸泡後(每次 40 分鐘)，包埋之。經包埋後之

蟲體以迴轉切片機切成 $7\mu\text{m}$ 厚的切片，再展片於載玻片，置於 37°C 烘箱中烘乾。切片以 HE (Hematoxylin-Eosin) 染色法染色後，以光學顯微鏡(Olympus BX50)觀察每隻病蟲之連續切片並照像之。再從各蟲體連續切片之照片計算每種組織細胞感染核多角體病毒之比例(每蟲體切片取 100 個相同的細胞計算其被感染率)。

四、病原體之萃取

分離病原體之方法依照前已發表文章(Chou *et al.*, 1996)外，再參考 Reinganum *et al.* (1970)與 Lery *et al.* (1997)所發表的方法，簡述如下：取大量飼育中自然罹病之蟲體約 100 隻(不分 P、F、N 組)，加入兩倍體積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，再將濾液分裝至離心管內，並與等體積的正己烷(n-hexane)均勻混合呈乳化狀。乳化液經 $400 \times\text{g}$ 在 4°C 下離心 15 分鐘後，可明顯分為上下兩層，先除去上層之有機溶液層以及漂浮於界面上的雜質，再分別取下層之水溶液層與沉澱物分別作進一步處理。前者經進一步分離的產物分別以 A，B，C 表示；而後者則以 A'，B'，C' 表示。

1. 水溶液部份，以 $2000 \times\text{g}$ 在 4°C 下離心 10 分鐘，將沉澱物(標示為樣本 A)以 0.05 M Tris 緩衝液(pH 7.5)再懸浮，並存於 4°C 下備用。而上清液，以 $15,000 \times\text{g}$ 在 4°C 下離心 30 分鐘後，將沉澱物(標示為樣本 B)以 0.05 M Tris 緩衝液(pH 7.5)再懸浮，並存於 4°C 下備用。而上清液，再以 $100,000 \times\text{g}$ 在 4°C 下超高速離心 1 小時 30 分鐘之後，倒除上清液，沉澱物(標示為樣本 C)以 0.05 M Tris 緩衝液(pH 7.5)再懸浮後，將此再懸浮液緩慢滴加在 15%–45% (w/w) 蔗糖連續密度梯度(sucrose density gradients)溶液上，

以 120,000 $\times g$ 在 4°C 下離心 2.5 小時。最後，收集散佈於蔗糖溶液中之病原體聚集帶，加入二次蒸餾水稀釋三倍，再以 100,000 $\times g$ 在 4°C 下離心 1.5 小時後，倒除上清液，沉澱物以少量之 0.05M Tris 緩衝液(pH 7.5)再懸浮後，保存在 4°C 下備用。

2. 沉澱物部份，加入適量的 STE 緩衝液(0.15 M NaCl; 0.02 M Tris; 1 mM EDTA; and 0.5% NP-40)，於 4°C 下劇烈振盪 5 分鐘，再於液態氮和 37°C 恆溫水浴內作冷凍與回溫(freeze and thaw)處理共 3 次，最後利用上述相同的分速離心法(2,000 $\times g$, 15,000 $\times g$, 和 100,000 $\times g$ 之沉澱物分別標示為樣本 A'、B'、和 C')，再以 15% ~ 45% (w/w) 蔗糖連續密度梯度離心(120,000 $\times g$, 2.5h)將病原體分離。

五、病原體之觀察

將樣本 A 和 A' 之再懸浮液滴於載玻片上，以光學顯微鏡(200x 及 400x)觀察。而樣本 B 和 B' 以及 C 和 C' 之再懸浮液則各取 10 μl 體積，以 2% 磷鎢酸(phosphotungstic acid)水溶液作負染色法(negative stain)處理，置於穿透式電子顯微鏡(Hitachi H7100)下(50,000x)觀察。

六、人工感染

分別取 0.7 ml 樣本 A, B, C 之再懸浮液與 0.3 ml 之 Tween-20 溶液混合，再均勻塗抹於新鮮的榕樹嫩葉上，待風乾之後，餵予已飢餓處理 12 小時之榕樹透翅毒蛾第 4 齡幼蟲，依序標示為 A 處理組、B 處理組、和 C 處理組。對照組則用滅過菌之 0.05 M Tris 緩衝液(pH 7.5)代替(含 30% Tween-20)，並以上述方法作處理。每組處理之幼蟲為 15 隻，連續觀察直至供試昆蟲死亡或羽化，並記錄每日之死亡蟲數。利用 Probit 法(Fin-

ney, 1971) 估算各處理組之半致死時間(LT₅₀)。

結 果

一、病徵之觀察

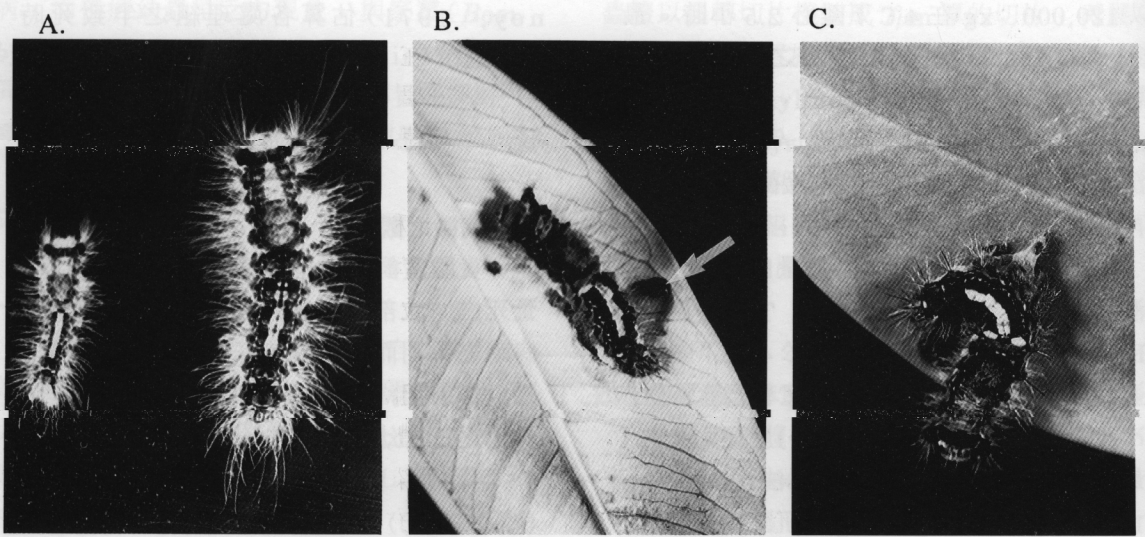
實驗室飼育之榕樹透翅毒蛾幼蟲發生大量死亡，大部份罹病死亡之蟲體，依病蟲發病時之齡期而各有其特殊的病徵。發病於初齡(1-3 齡)時，病蟲有發育滯怠現象，較同期孵化之正常幼蟲矮小許多(圖一 A)。發病於 4-5 齡幼蟲，則病蟲會有下痢現象與乏力現象(圖一 B, C)，並偶有紅褐色糞便及脫肛的現象發生。死蟲表皮完整，中腸部位之皮膚呈現灰白略透明狀，與感染核多角體病之蟲體，全身腫脹，腹面呈白灰色，表皮脆弱易破的現象有異。若發病於蛹期時，其蛹體呈綠化現象。

二、軟化症幼蟲之血淋巴液檢測

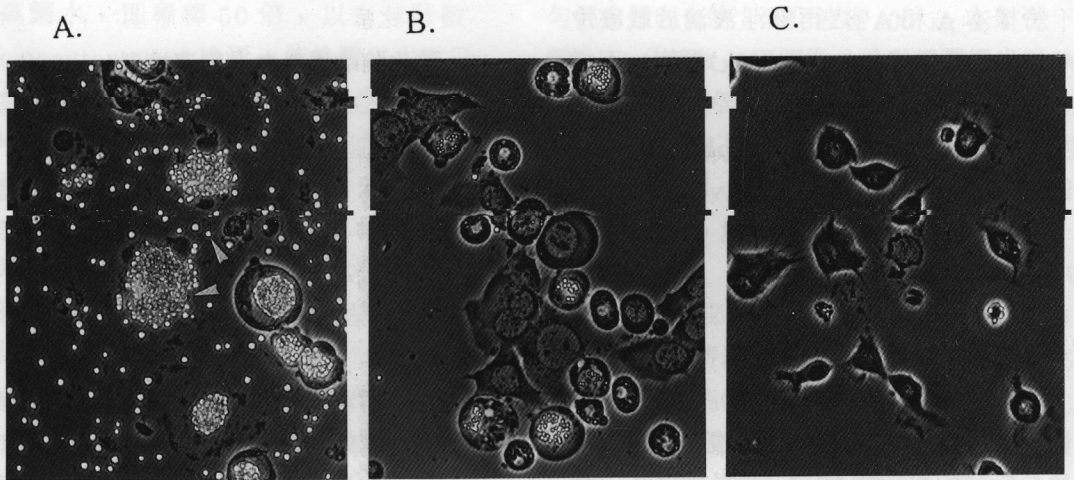
病蟲之血淋巴液中未發現有菌血現象，除血球細胞、組織碎片外，並可見游離的多角體及充斥多角體的感染細胞。將 150 隻檢體依血液中含有多角體數目的多寡，分為多角體(P)、少多角體(F)、和無多角體(N)三組，其各佔檢體比例為 48%，39%，和 13%。

P 組病蟲之血液呈白色或淡黃色，鏡檢下細胞之核中充斥多角體的血球細胞達 100%，並有多數細胞已經破裂，而多角體已流出呈空泡狀，因此血液中含大量的游離的多角體(圖二 A)，其每 1 μl 血淋巴液含多角體數達 $(8.32 \pm 3.42) \times 10^5$ (mean \pm S.D.)。

F 組病蟲之血液呈透明狀，鏡檢下細胞之核中含有多角體的血球細胞約佔 10%-20%，雖然血球細胞被核多角體病毒感染比例並不算高，且血淋巴液中只含極少



圖一 罹患軟化症之榕樹透翅毒蛾幼蟲所呈現之病徵。A：發育滯怠現象之幼蟲(左)；與同期孵化之正常幼蟲(右)；B：下痢現象；C：乏力現象
 Fig. 1. Symptoms of *Perina nuda* larvae with flacherie. A: severe retardation of development (left); contrast to normal larvae at the same age (right); B: dysenteric conditions; C: loose hanging. (bar=0.5 cm)



圖二 軟化症幼蟲之血淋巴液檢測。A：多角體(如指針所示)(P)；B：少多角體(F)；C：無多角體(N)
 Fig. 2. Hemolymphs from larvae with flacherie. A: polyhedra (arrows) (P); B: few polyhedra (F); C: no polyhedra (N). (bar=25 μ m)

量游離的多角體，然而多數血球細胞呈圓球狀並已失去附著能力，其細胞核腫大，而細

胞質內含有大量的顆粒物質(圖二 B)。F 組病蟲之每 1 μ l 血淋巴液含多角體數為 $(3.55 \pm$

$2.15) \times 10^3$ (mean \pm S.D.)。

N 組病蟲之血液呈透明狀，鏡檢其血球細胞仍具有正常的附著能力，無明顯感染核多角體病毒之病徵(圖二 C)，其血液中含多角體。

三、病原體之分離與觀察

在水溶液部份之分速離心的過程中，樣本 A 在光學顯微鏡觀察下，除蟲體腸內細菌以及組織碎片，只含少量的多角體；樣本 B 在電子顯微鏡觀察下，含有核多角體病毒之核蛋白質鞘(nucleocapsid)與小塊的蟲體組織碎片；樣本 C 則發現除一些小的蟲體組織碎片外，還發現約 30 nm 之小病毒粒子。再經蔗糖連續密度梯度進一步分離純化後，進一步在電子顯微鏡下証實是一種呈等軸(isometric)之正二十面體，直徑約為 30 nm，邊長約為 15 nm，不具被膜(envelope)和明顯的表面構造之小病毒粒子(圖三)。在此純化的小病毒粒子樣品中，空囊鞘的粒子約佔

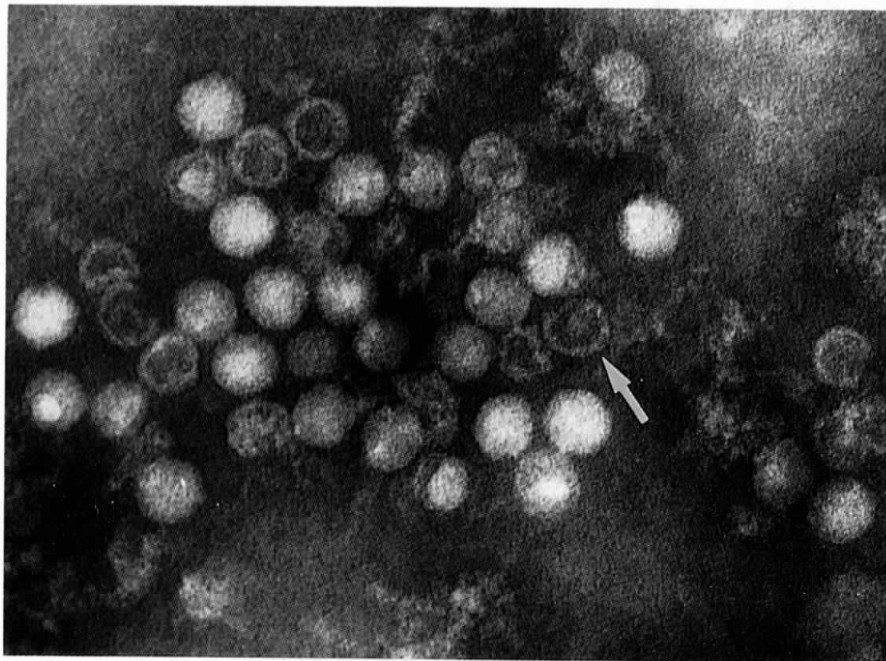
1 / 4。

至於在沈澱物部分，樣本 A'、B'，和 C'，在光學及電子顯微鏡觀察的結果，除多角體、細菌、及細胞碎片外，並未有進一步的發現。

P、F 和 N 組病蟲各取 20 隻，利用上述相同方法萃取病原體，結果皆可分離到上述之小病毒粒子，且數量上無明顯的差異。

四、病蟲組織之核多角體病變的觀察

病蟲體內之大部份組織皆受到核多角體病毒的感染，嚴重感染的細胞之細胞核腫大，核內充斥著結晶狀之小體—核多角體(polyhedra)，且有一深染的團狀物，即所謂的病毒形成團(virogenic stroma)，有些細胞之細胞質幾乎不能辨識。至於感染程度輕微的細胞，細胞則有變圓，雖然細胞核腫大但並未見多角體，而有深染之顆粒及病毒形成團。矮化症之病蟲與下痢症之病蟲在組織病理之觀察結果差異不大(表一)。綜合討論



圖三 從軟化症蟲體分離純化之直徑約30nm的小病毒粒子。部份粒子為空殼鞘(如箭頭所示)。

Fig. 3. Particles of a 30-nm-diameter isometric virus isolated from larvae with flacherie. Some particles were partially disrupted. (bar=80 nm)

組織感染的情形，可區分成三種不同的感染程度：

表一 榕樹透翅毒蛾混合感染具核多角體病變的組織
Table 1. Tissues with nucleopolyhedrosis in their homogenous host, *P. nuda* infected by PenuNPV and PnPV

組織	PenuNPV & PnPV	
	矮化症	下痢
表皮細胞	+++	+++
氣管	+++	+++
前腸	-	--
中腸	++	++
後腸	-	--
脂肪體	++	++
馬氏管	-	+
肌肉	±	±
生殖腺	±	+
神經	±	±
絲腺	-	-
血細胞	-	+

「+++」組織之細胞感染嚴重(>90%)
 「++」組織之細胞感染較不嚴重(40%~80%)
 「+」組織之細胞感染嚴重(<40%)
 「±」組織之鞘細胞受感染
 「-」組織之細胞不受感染

1. 感染嚴重之組織：圖四 A~C 和表一

表皮之表皮細胞(epidermal cells)、氣管之氣管細胞(tracheal cells)、脂肪體(fatty body)之細胞、中腸之柱狀細胞(columnar cells)以及再生細胞(regenerated cells)皆可見嚴重感染現象。表皮細胞有80%~90%的感染率，其核內具明顯的多角體和病毒形成團，原為扁平細胞腫脹成立方體細胞，甚至有些已與表皮剝離(圖四 A)；氣管細胞感染率亦為80%~90%，細胞腫脹亦呈立方體或柱狀，胞質乃可辨識，有些部位之氣管細胞層與氣管剝離，細胞核病徵如同表皮細胞(圖四 B)；脂肪細胞的感染率較表皮細胞和氣管細胞相對地低，約在50%~60%之間，細胞病變亦相當典型，胞質有些則成空泡化(圖四 B, D)；中腸部分的

柱狀細胞感染率也很高，然而再生細胞的感染率則較低為20%~30%，杯狀細胞(goblet cell)未見有明顯的細胞病變，但是細胞前端膨大成空泡狀，有分泌亢進(hyperfunction)的現象，整個中腸組織因細胞不正常的腫脹及相互間擠壓的結果，促使細胞層從腸壁剝離。前腸和後腸則未見感染。

2. 感染不嚴重的組織：圖四 D~I 和表一

馬氏管、肌肉、生殖腺與神經皆屬不嚴重感染的組織。馬氏管之立方體狀上皮細胞，只有少部分呈典型的多角體病變，然而多數細胞萎縮，細胞間隙加大，但未見細胞層有剝離現象，易被誤認為是未感染組織；肌肉組織內之肌肉細胞並未受感染(圖四 E)，但是肌肉外圍的鞘細胞則有受病毒感染現象(圖四 F)；有關生殖腺之卵巢(ovary)部分，卵巢外之鞘細胞亦受感染，而發育中卵細胞未見感染，但濾泡細胞(follicle cells)有少數被感染(圖四 G)。精囊(testes)與卵巢的情形類似，鞘細胞亦受感染，精母細胞及發育中之精細胞亦有少數受到感染(圖四 H)；至於神經的部分，可見少數神經細胞被感染，並呈可鑑識的病毒形成團，但運動神經元則未見有被感染的徵兆(圖四 I)。

3. 未受病毒感染：

絲腺是唯一不受感染的組織，絲腺細胞乃呈大型立方體構造，胞質與胞核皆呈強烈的嗜鹼性(圖四 J)。

五、人工感染

將樣本 A, B, C 之再懸浮液感染第 4 齡幼蟲。結果顯示，A 處理組與 B 處理組之幼蟲皆感染核多角體病。然而，A 處理組於感染第 7 天起有幼蟲死亡，至感染第 13 天則全數幼蟲死亡；B 處理組則於感染第 9 天才有幼蟲死亡，亦至感染第 13 天全數幼蟲死亡。此兩組處理組之幼蟲死亡率皆為 100%

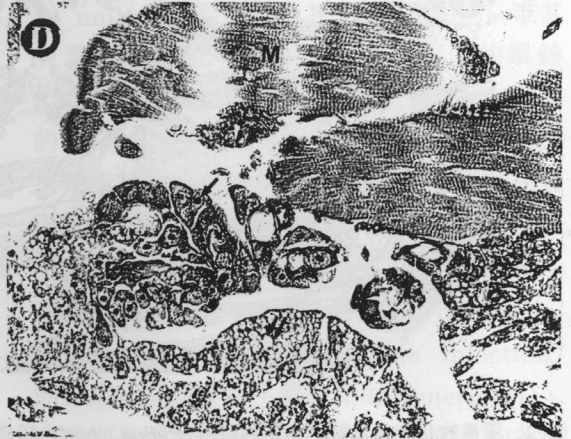
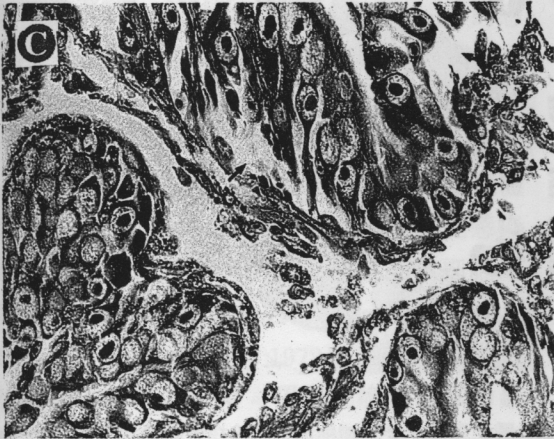
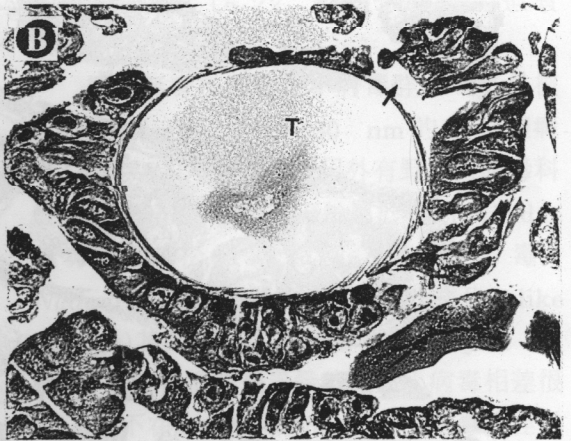
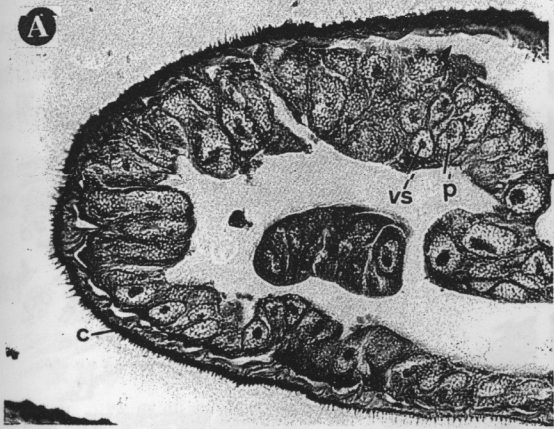
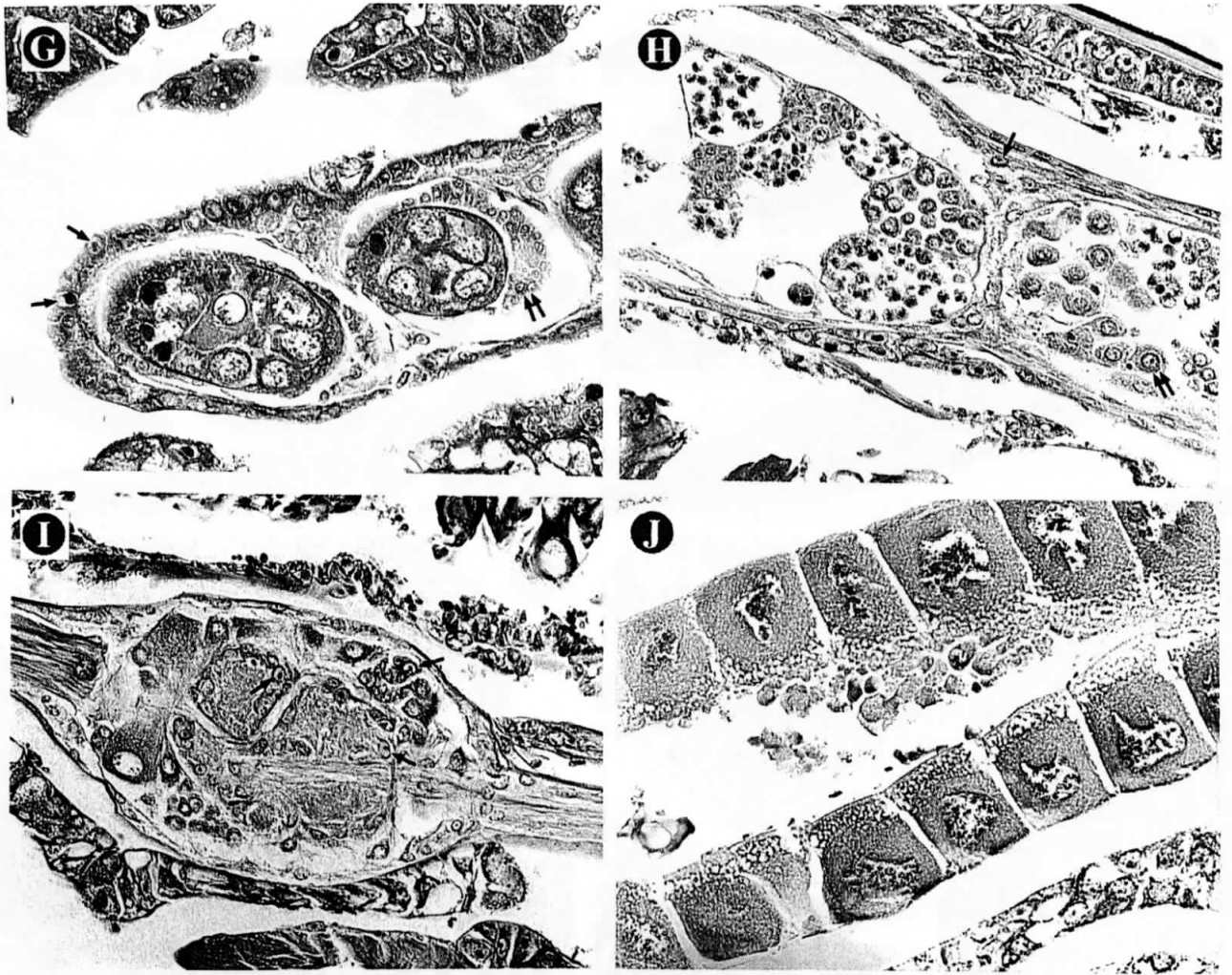


Figure 1. Histological sections of the silkworm, *Bombyx mori*, showing the effects of the mulberry透毒蛾幼虫化症病毒 (MTCV). A: Larva showing a typical CPE (arrow) with several cells in the midgut. B: Larva showing a typical CPE (arrow) with several cells in the midgut. C: Larva showing a typical CPE (arrow) with several cells in the midgut. D: Larva showing a typical CPE (arrow) with several cells in the midgut. E: Larva showing a typical CPE (arrow) with several cells in the midgut. F: Larva showing a typical CPE (arrow) with several cells in the midgut.



圖四 罹患軟化症之五齡榕樹透翅毒蛾 (*Perina nuda*) 組織切片圖。圖表示受到榕樹透翅毒蛾核多角體病毒 (*P. nuda* nucleopolyhedrovirus, PenuNPV) 感染的組織：(1) 嚴重感染的組織包括表皮 (圖A)、氣管 (圖B)、中腸 (圖C) 以及脂肪 (圖D)；(2) 感染較不嚴重的組織包括馬氏管 (圖E)、肌肉 (圖F)、生殖腺：卵巢 (圖G) 和精巢 (圖H)，以及神經 (圖I)；(3) 不受感染的組織只有絲腺 (圖J)。感染嚴重的細胞呈典型核多角體病變，如細胞圓化、核腫大、核內充斥多角體 (P) 以及含有深染的病毒形成團 (VS)，甚至細胞層有與組織剝離現象 (指針)，如表皮細胞和表皮 (C) 剝離，氣管細胞和氣管 (T) 剝離，中腸細胞和基底膜分離 (圖A, B 及 C)。有些脂肪細胞 (F) 呈典型核多角體病變 (指針)，有些則空泡化 (雙指針) (圖D)。馬氏管 (Ma) 之細胞層中，只有少數細胞呈核多角體病變 (指針)，多數萎縮且細胞間隙加大 (雙指針) (圖E)。肌肉組織 (M) 中只有鞘細胞受感染 (指針) (圖F)。生殖腺除鞘細胞感染外 (指針)，濾泡細胞及精細胞亦受感染 (雙指針) (圖G 及 H)。神經節內有些細胞元亦受感染 (指針) (圖I)。絲腺構造則未見可鑑識的細胞病變 (圖J)。(bar=50 μ m)

Fig. 4. Light micrographs of 5th-instar larvae of *P. nuda* with flacheries disease showing: (1) seriously infected tissues of the epidermis (A), trachea (B), midgut (C), and fat body (D); (2) moderately infected tissues of the malpighian tube (E), muscle (F), gonads: ovary (G) and testes (H), and nerve (I); and (3) non-infected tissue: silk gland (J). A typical cytopathic effects (CPE) of the nucleopolyhedrosis were found in cells of seriously infected tissues that are round cells; hypertrophic nucleus filled with polyhedra (P) and containing a virogenic stroma (VS). Cell layers of 3 seriously infected tissues detached from their basement membrane or cuticle (C)(arrows); tracheal cells from trachea (T) and midgut cells detached from their basement membrane(A, B, and C). Some fatty body (F) showing a typical CPE (arrow) while several cells are vacuolated(D). A few cells of the Malpighian tube (Ma) showeing a typical CPE, while most cells are atrophic (double arrows)(E). Only the sheath cells of muscle (M) were infected(F). The gonad was infected not only in sheath cells (arrow) but also follicle cells or spermatid (double arrows) (G and H). Neurons in the ganglion were infected (arrow) (I). No detectable CPE was found in the silk gland (J).

，其半致死時間(LT₅₀)分別為 8.52 及 10.44 天。而 C 處理組與對照組之幼蟲皆能成功化蛹，但是 C 處理組蛹之羽化率只達 60%，而對照組蛹之羽化率則達 83%，鏡檢此兩組未成功羽化之蛹體皆發現大量的核多角體病毒之多角體。

討 論

家蠶軟化症是最早被描述的昆蟲軟化症之疾病。罹患此病的家蠶，在中腸細胞的胞質內發現有小 RNA 病毒(picornavirus)的感染，有些細胞的胞核內有小 DNA 病毒(parvovirus)的感染(Matsui *et al.*, 1977)。此二病毒統稱為軟化症病毒(Flacherie virus)，被認為是引起家蠶軟化症之主要病原體(Tanada and Kaya, 1993)。其主要是感染家蠶中腸上皮之杯狀細胞，造成杯狀細胞之剝離及中腸生理機能的退化(Iwashita, 1965; Inoue and Ayuzawa, 1972)，並且引發大量腸內細菌的二次感染。罹患此病之家蠶幼蟲初期病徵並不明顯，隨著病情的發展，逐漸出現食欲減退，行動遲緩，體軀瘦小等病徵，或因痢疾而呈現萎縮或軟腳的症狀。此時，胸部變透明，開始出現此病徵至死亡，在急性病發者只需十幾個小時，於死前常有嘔吐腹瀉現象，尾部往往粘有紅褐色糞便(Lu, 1982)。雖然榕樹透翅毒蛾軟化症的許多病徵與家蠶軟化症之病徵雷同，就萃取之病毒的種類和大小與家蠶軟化症病毒比較，家蠶軟化症之小 RNA 病毒的大小為 22-30 nm，因此榕樹透翅毒蛾軟化症的小病毒其大小較一致，其直徑約為 30 nm，亦屬於小 RNA 病毒群，此小 RNA 病毒被命名為 PnPV (*P. nuda* picorna-like virus)，其特性已於另篇報導描述。再者，榕樹透翅毒蛾軟化症之病原體萃取液中未有大小類似小 DNA

病毒(直徑為 18-22 nm)的發現，但有 PenuNPV 之發現。

感染無脊椎動物之小病毒群中，不具被膜(envelope)，直徑約 30 nm 的 20 面體病毒，除小 RNA 病毒外，另外有野田村病毒科(Nodaviridae)種類。至於屬於 Tetraviridae 種類，如松天蠶蛾 β 及 ω 群病毒(*Nadaurelia capensis* β -like viruses 及 ω -like viruses)其直徑約為 40 nm (Murphy *et al.*, 1995)，較榕樹透翅毒蛾軟化症小病毒相差很大，則不在本文討論內。野田村病毒直徑為 30 nm，病毒形態與小 RNA 病毒相同，唯其病毒的基因組中含有兩段大小不同的單鏈 RNA，而小 RNA 病毒只含有一條大小相同的 RNA (Murphy *et al.*, 1995)。因此，榕樹透翅毒蛾軟化症小病毒之分類地位，需在基因組成份確定後才能定位，此特性鑑定已於另篇報導中證實此小病毒是屬小 RNA 病毒。昆蟲同時受到兩種病毒之混合感染(mixed infection)，或稱雙重感染(double infection)的結果，有些會產生協力作用(synergism)，有些則是干擾作用(interference)，有的各自獨立，不產生干擾作用，亦即感染力與發病率互不影響。在國外已有相關研究的報導，如歸類於松天蠶蛾 β 病毒群的 *Trichoplusia ni* RNA virus (TRV)，被發現與核多角體病毒混合感染加州苜蓿夜蛾(*Autographa californica*) (Morris *et al.*, 1979)。若單獨感染 TRV 時，會造成幼蟲中腸部位之皮膚呈現灰白色，以及體重減輕和發育滯怠現象，罹病幼蟲的體重較同日齡之未感染者小 13 倍之多(Vail *et al.*, 1983a)。而與核多角體病毒同時感染時，罹病幼蟲雖然體重減少，但其體內幾乎找不到 TRV 病毒(Vail *et al.*, 1983b)。依病徵而言，此混合感染與榕樹透翅毒蛾軟化症病徵相同，然而本研究證實核多角體病毒與小病毒混合感染榕樹透翅毒蛾

而引發軟化症，雖然 P, F 及 N 組之罹病幼蟲皆可分離到小 RNA 病毒，但是在每隻病蟲之核多角體產量上，F 組明顯少於 P 組約 200 至 800 倍，而 N 組更是不具多角體。P 組可被認為 PenuNPV 感染佔優勢的蟲體，而 N 組則為小 RNA 病毒佔優勢的蟲體，至於 F 組則為兩種病毒互相影響的結果。但小 RNA 病毒感染的部位並未能在光學切片上鑑識出。

感染核多角體病毒之典型病徵是感染核多角體病幼蟲體軀腫大，節間膜露出，進而器官液化且表皮脆弱易破裂而流出白色膿汁，罹患軟化症之榕樹透翅毒蛾幼蟲瀕死之前有下痢現象，經由鏡檢雖可觀察到體內有多角體的存在，但表皮未見脆弱，經切片觀察，蟲體體內器官及體壁也未見有液化現象，此點顯然與典型核多角體病徵不同。雖然切片中並無法確定病蟲感染小 RNA 病毒之部份，但可確定的是，罹病幼蟲器官未達液化前即死亡，顯然是受到另一種病毒的感染所造成的結果，相信是小 RNA 病毒協力的結果。病蟲有下痢、杯狀細胞不正常的分泌亢進現象，很可能亦為小 RNA 病毒感染所造成，此部份有待進一步電顯切片觀察。由切片可確定病蟲組織受核多角體病毒感染之嚴重的部位(表皮細胞、氣管及肌肉鞘細胞)，與 Vail and Jay (1973)的報告並無差異，神經細胞也有受到感染現象，推測核多角體病毒可穿透神經組織使幼蟲神經感染而使幼蟲的反應及行動遲緩；卵巢及精巢也受到核多角體病毒感染，因卵巢的濾泡細胞可見病毒多角體，病毒經精子與卵垂直傳播至下一代可能性很大。

多年來的實驗可知，軟化症病徵常見於榕樹透翅毒蛾幼蟲，本人認為自然界中核多角體病毒與小 RNA 病毒混合感染的情形是相當普遍，由感染實驗得知小 RNA 病毒致病力

並不強，所以小 RNA 病毒即有可能以持續性感染於此蛾類族群中，而與核多角體病毒混合感染時則有協力作用，使病蟲提前死亡(組織未完全液化)。另一方面，病蟲提前死亡，核多角體病毒嚴重感染組織只出現在某一些部位，所以幼蟲多角體的形成必少於典型罹患核多角體病所形成的多角體，若利用幼蟲大量生產多角體時，小 RNA 病毒必使核多角體病毒在幼蟲體內的產量降低，因此小 RNA 病毒會干擾多角體產生現象。小 RNA 病毒的宿主範圍及影響幼蟲的層面則有待進一步研究。相同的，此小 RNA 病毒對核多角體病毒具協力性的殺蟲效果值得進一步探討，但對利用蟲體量產核多角體病毒以為生物製劑之用時，則肯定有負面的結果(如 F 組)。往後深入研究兩病毒混合感染之互動現象，無論在病理學上還是在微生物殺蟲劑開發上都具有其意義。

在人工感染的試驗中，A 處理組與 B 處理組感染的病蟲皆因罹患核多角體病而死亡。C 處理組之幼蟲並無明顯罹患軟化症之病徵，因此推測此種小 RNA 病毒若單獨感染則其病源性並不顯著，尤其對於感染齡期較大(4 齡以上)之榕樹透翅毒蛾幼蟲更不明顯。此小 RNA 病毒是否以持續性(或潛伏性)感染的現象存在榕樹透翅毒蛾族群中則須在抗體及核酸探針製作成功之後，才能進行。再者，雖然此病毒造成齡期較大的幼蟲罹病死亡的機率並不高，卻會影響寄主昆蟲之發育，並且干擾核多角體病毒之感染及增殖，相信此病毒在自然界中，亦扮演相當的角色。因此，此小 RNA 病毒的分類地位，體外增殖和基因組的研究，以及開發成有效率的檢測方法皆是本研究未來的重點。

誌 謝

本研究承蒙農委會(86-AST-1.1-FAD-42-2)經費補助得以順利完成,謹以誌謝。

參考文獻

- Chao, C. L.** 1982. Lymantriidae. pp. 163-189. in C. P. Hsieh, ed. Inconographia Heterocerorum Sinicorum II. Science Press, Beijing (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.
- Chu, H. F.** 1980. Atlas of Moths. Science Press, Beijing. 158 pp (in Chinese).
- Finney, D. J.** 1971. Probit Analysis. 3rd. ed. Cambridge Univ. Press, London. 333 pp.
- Inoue, H.** 1982. Lymantriidae. pp. 682-638. in H. Inoue, S. Sugi, H. Kuroko, S. Moriuti, and A. Kawabe, eds. Moths of Japan. Vol. 1. Kodansha. Tokyo (in Japanese).
- Inoue, H., and C. Ayuzawa.** 1972. Fluorescent antibody study of an infectious flacherie of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Invertebr. Pathol.* 19: 227-230.
- Iwashita, Y.** 1965. Histo- and cytopathological studies on the midgut epithelium of the silkworm larvae infected with infectious flachrie. *J. Seric. Sci. Jpn.* 34: 263-273.
- Lery, X., G. Fediere, A. Taha, M. Salah, and J. Giannotti.** 1997. A new small RNA virus persistently infecting an established cell line of *Galleria mellonella*, induced by a heterologous infection. *J. Invertebr. Pathol.* 69: 7-13.
- Lu, H. S.** 1982. Insect Virus and Insect Virus Disease. PP. 150-154. Science Press, Beijing (in Chinese).
- Matsui, M., S. Maeda, and H. Watanabe.** 1977. Some properties of a small flacherie virus of the silkworm, *Bombyx mori* L. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 21: 79-84.
- Mazzone, H. M.** 1985. pp.695-734 in: K. Maramorosch, and K. E. Sherman, eds. Viral Insecticides for Biological Control. Academic Press, London and New York.
- Morris, T. J., R. T. Hess, and D. E. Pinnock.** 1979. Physicochemical characterization of a small RNA virus associated with baculovirus infection in *Trichoplusia ni*. *Intervirology* 11: 238-247.
- Murphy, F. A., C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. Martelli, M. A. Mayo, and M. D. Summers.** 1995. Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses: Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Virus. *Arch. Virol. Suppl.* 10. Springer-Verlag, Wien. 586 pp.
- Paillet, A.** 1941. Les travaux de Pasteur

- sur la flacherie et les théories modernes sur la pathologie du tube intestinal du Bombyx du murier. *Ann. Epiphyt.* 7: 99-117.
- Reinganum, C., G. T. O'Loughlin, and T. W. Hogan.** 1970. A nonoccluded virus of the field crickets *Teleogryllus oceanicus* and *T. commodus* (Orthoptera: Gryllidae). *J. Invertebr. Pathol.* 16: 214-220.
- Su, S., and B. J. Chen.** 1985. Pests control of garden and forest. Guangdong Science and Technology Press, Guangzhou, China. pp. 372-373 (in Chinese).
- Tanada, Y., and H. K. Kaya.** 1993. Other RNA-viral infections. pp. 296-310 in: Y. Tanada, H. K. Kaya, eds. *Insect Pathology*. Academic Press, California.
- Vail, P. and D. L. Jay.** 1973. Pathology of a nuclear polyhedrosis virus of alfalfa looper in alternate hosts. *J. Invertebr. Pathol.* 21: 198-204.
- Vail, P. V., T. J. Morris, and S. S. Collier.** 1983a. An RNA virus in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus preparations: gross pathology and infectivity. *J. Invertebr. Pathol.* 41: 179-183.
- Vail, P. V., T. J. Morris, and S. S. Collier.** 1983b. An RNA virus in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus preparations: incidence and influence on baculovirus activity. *J. Invertebr. Pathol.* 41: 171-178.
- Wang, C. H., and S. J. Tasi.** 1995. Life history of the *Perina nuda* (Fabricius) and virus production of the infected pupae. *Chinese J. Entomol.* 15: 59-68 (in Chinese).
- 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.
- Yi, S. T.** 1969. Pests of broadleaves: *Perina nuda*. pp. 309-310. in: S. T. Yi, eds. *Economic Entomology*, Vol. 2. Cheng Chung Book Co., Taipei (in Chinese)

收件日期：1998年9月17日

接受日期：1998年11月11日

Studies on the Infectious Flacherie of *Perina nuda* (Fabricius)

Chung-Hsiung Wang*, Chih-Yu Wu, Wei-Yung Chen, Chih-Wei Chen

Department of Entomology, National Taiwan University, 1 Roosevelt Road, Sec.4, Taipei, Taiwan, R.O.C.

ABSTRACT

Recently, disease outbreaks had caused mass mortalities of laboratory-reared larvae of the ficus transparent wing moth, *Perina nuda* (Fabricius). Moribund larvae exhibited a syndrome similar to silkworms infected with infectious flacherie virus. Two viruses, *P. nuda* nucleopolyhedrovirus (PenuNPV) and a new picorna-like virus (named PnPV), have been isolated from infected larvae with flacherie disease. Negatively stained preparations showed that the virus exhibits icosahedral symmetry and measures 30 nm in diameter with no envelope and no distinct surface structures. The hemolymph of moribund larvae with flacherie disease is either with or without free polyhedra caused by the infection of PenuNPV. The oral-infection experiments showed that pathogenesis of the picorna-like virus is not obvious, but it may cause a synergistic effect in mortality and decrease the yield of polyhedra in infected *P. nuda* larvae with PenuNPV.

Key words: *Perina nuda*, flacherie, PenuNPV, insect, picorna-like virus.