

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

斜紋夜蛾微粒子蟲之研究：核糖體，極管蛋白及孢壁蛋白
基因(1/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2313-B-002-360-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：國立臺灣大學昆蟲學系暨研究所

計畫主持人：王重雄

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 6 月 3 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告 期中進度報告

中進度
報告

斜紋夜蛾微粒子蟲之研究：核糖體，極管蛋白及孢壁
蛋白基因

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 91-2313-B-002-360

執行期間：91年8月01日至92年7月31日

計畫主持人：王重雄

共同主持人：

計畫參與人員：

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢
 涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公

開查詢

執行單位：國立台灣大學昆蟲學系

中 華 民 國 92 年 5 月 31 日

中文摘要

分離自五種鱗翅目昆蟲 (斜紋夜蛾、甜菜夜蛾、番茄夜蛾、小菜蛾和紋白蝶) 之微孢子蟲分離株，其孢子外觀形態相似。以斜紋夜蛾第三齡幼蟲測試不同分離株之致病力，其中以甜菜夜蛾分離株之致病力最強，而小菜蛾分離株雖然致病力較弱，但有較高之孢子產量；而此五分離株均可以代用寄主——斜紋夜蛾幼蟲增殖。依西方轉印法之結果，此五分離株可分為三種血清型，小菜蛾分離株為獨特之一群，另二群為斜紋夜蛾微孢子蟲／紋白蝶分離株以及甜菜夜蛾／番茄夜蛾分離株。然而這些分離株於 SSUrRNA 基因序列資料上並無顯著的不同，研判其皆屬於微孢子屬 (*Nosema*) 的種類。但利用逢機增幅 DNA 多型性聚合酵素鏈反應 (RAPD-PCR) 則可區別出不同分離株。自五組 (OPA, OPAC, OPBD, OPO, and OPU) 商業化引子組中共篩選 60 個引子做為五分離株分析之用。使用 UPGMA 法分析可將五分離株歸為與血清型相同之三型。RAPD-PCR 方法可用於快速且有效確認微孢子蟲的分離株或種類，特別是一些缺乏超微結構資料的種類。另一方面，利用偵測家蠶微孢子之特異性引子檢測這些分離株，只有小菜蛾分離株可以順利增幅出預期之產物。這可能暗示小菜蛾分離株可能與模式種家蠶微孢子有更密切的關係。以上結果已發表於 *Journal of Invertebrate Pathology*, 83 (2003) pp. 51-59。

關鍵詞：孢子蟲、斜紋夜蛾、微孢子屬。

Abstract

The morphologically similar spores of five microsporidian isolates were collected from five important lepidopteran pests: *Spodoptera litura*, *S. exigua*, *Helicoverpa armigera*, *Plutella xylostella*, and *Artogeia* spp. in Taiwan during seasonally epizootic microsporidiosis. The isolate from *S. exigua* had the highest virulence to third-instar larvae of *S. litura*. The isolate from *P. xylostella* had the lowest virulence but yielded more progeny spores in the infected larvae than other isolates. This result showed that these isolates have high production in alternate hosts. The phylogenetic relationships of these five isolates were analyzed by immunological relationship and the homology of the small subunit rDNA sequences. Based on the patterns of Western-blot hybridization, three serotypes could be identified. The isolate from *P. xylostella* is a unique serotype, and the other two

serotypes are *N. spodopterae/Artogeia* spp., and *S. exigua/H. armigera*. There were no significant differences in the SSUrDNA sequences, suggesting that they all belong to the genus *Nosema*, but they could be distinguished by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR). Five commercial primer sets (OPA, OPAC, OPBD, OPO, and OPU), with each set containing 20 primers, were used for this study. Using each microsporidian DNA with every primer for PCR amplification, the yields of RAPD-PCR profiles were compared. Sixty primers were selected and suggested for intra- or interspecies microsporidian identification and also for phylogenetic analysis for these five isolates. Based on the analysis of the Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages (UPGMA) applying software from the NTSYS-pc v. 2.01b, isolates could be clearly divided into three groups, the result is coincident with the serotypes. RAPD-PCR analysis of microsporidian DNA, as shown in these studies, is a readily available, rapid method for distinguishing and confirming microsporidian species and isolates, especially those for which ultrastructural studies are lacking. In addition, we used a *N. bombycis* specific primer pair to detect our isolates by polymerase chain reaction. The result implied that the isolate of *P. xylostella* was closely related with *N. bombycis*. This work has been published in Journal of Invertebrate Pathology, 83 (2003) pp. 51-59.

Keywords: microsporidia, *Spodoptera litura*, *Nosema*

壹、前言

關於微孢子蟲的分類方式，最早是由 Kudo (1924) 所提出。現行分類系統中，主要仍是以形態構造上之特徵為主，利用穿透式電子顯微鏡觀察各期生活史中的超微結構用以區分，這些特徵包含有孢子的大小和形態、極絲纏繞圈數、核的數目、染色體循環及寄主範圍等 (Canning *et al.*, 1986; Sprague *et al.*, 1992)，但上述特徵仍無法解釋不同屬間的關係。

微孢子蟲同屬種類間由於 rRNA 序列的相似程度太高，無法明顯地以 rRNA 進行鑑定的工作 (Canning *et al.*, 1999a)。因此必須利用其他的方法進一步加以確認。以隨機引子利用聚合酵素鏈鎖反應合成 DNA 片段之多型性 (random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction, RAPD-PCR)，可以提供快速檢查遺傳上的差異，而不須用到選殖技術或是放射性同位素標定等技術 (Loxdale and Lushai, 1998)。此法可彌補 rRNA 分析不足之處，對於關係相近的種類或分離株做進一步的區分。

第一篇言及斜紋夜蛾受到微孢子蟲感染為一日文文獻，地點為廣島縣福山市，時間為 9 月 (岡田，1970)。但該文僅有關於感染微孢子蟲的文字敘述。1976 年 Watanabe 以光學顯微鏡觀察，並確認其為 *Nosema* 屬之種類。同時也記錄了 *N. bombycis* 和 *N. mesnili* 均會感染斜紋夜蛾。1979 年印度記錄了一則有關微孢子蟲與核多角體病混合感染斜紋夜蛾的文章，但只有文字上的描述 (Narayanan and Jayaraj, 1979)。李和問 (1987) 報導了寄生於斜紋夜蛾的微孢子蟲新種，定名為 *N. liturae*。這是第一篇有關感染斜紋夜蛾之微孢子蟲具有電顯切片的資料，寄主範圍與 Watanabe (1976) 的報告類似。*N. liturae* 曾出現於 Ke *et al.* (1990) 的文章中，利用家蠶微孢子蟲之單株抗體偵測發現其與家蠶微孢子蟲關係相近，但應不屬於同一種。徐 (1987) 之博士論文為台灣首次以電顯切片觀察鱗翅目寄主之微孢子蟲，並於 1992 年發表為新種 *N. spodopterae* (徐等，1992)。1995 年馬來西亞

首次報導了分離自斜紋夜蛾的微孢子蟲 (Sajap, 1995)，同樣也是在由野外移入實驗室內飼養的族群中發現，記錄了有關感染的組織。而另一日本甜菜夜蛾分離株 *Nosema* sp. Y9101 (安永等, 1992)，以單株抗體偵測之結果認為其與模式種家蠶微孢子蟲應是同一種。

感染紋白蝶的微孢子蟲方面，Watanabe (1974) 報導了紋白蝶受到微孢子蟲感染，此種微孢子蟲被鑑定為 *N. mesnili*。阿部和河原? (1988) 檢視源於紋白蝶的四個分離株，分別為 *Pleistophora* (後更換屬名為 *Endoreticulatus*) *schubergi* 一株，*N. bombycis* 一株和 *N. mesnili* 二株。同時利用螢光抗體檢測得到 NB-Prc-SES-H7901 與家蠶微粒子的抗血清有正反應，而有二株與 *N. mesnili* 的抗血清有正反應，分別為 NM-Prc-SES-H7901 與 NM-Prc-SES-A8301。

關於小菜蛾分離株的報告，馬來西亞報導了關於小菜蛾受微孢子蟲感染，但該篇僅用 Giemsa 染色法即認定其為 *N. bombycis* (Idris *et al.*, 1997) 似乎有些牽強。1998 年 Nahif 和 Jungen 發表了德國之小菜蛾受到 *Vairimorpha* 屬之微孢子蟲感染，因其具有兩種型式的孢子且有溫度應變效應。翌年於英國將一株分離自小菜蛾的微孢子蟲命名為 *V. imperfecta* 是因為其具有不完全的八孢子時期 (octosporous sporogony) (Canning *et al.*, 1999a)，然而其 SSUrRNA 序列卻與 *N. bombycis* 較相似。

在形態與分子資料相衝突的狀況下，認為應以形態的特徵為優先，同時指出高保守基因對於相近的種類區分並無助益，甚至是一些形態上可以區辨的種類 (Canning *et al.*, 1999a)。在 SSUrRNA 親緣分析上關係相近的兩個屬 *Nosema* 和 *Vairimorpha*，因為孢子的形成方式不同而被置於不同的科中，甚至於 Sprague *et al.* (1992) 的分類系統中是置於截然不同的兩個目，Canning *et al.* (1999a) 認為應將這兩屬歸於微孢子科 (Nosematidae) 中。

受到微孢子蟲感染的斜紋夜蛾幼蟲外觀上並無顯著病徵，但會造成取食意願降低，發育遲緩，或有蛻皮不完全的現象產生。併發全身系統性感染 (systemic infection) 時則蟲體全部組織皆被感染，只剩表皮部分未被破壞。此點可與常見的斜紋夜蛾核多角體病毒 (SpltNPV) 感染時會使表皮易碎、流出濃汁的現象做明顯的區分。斜紋夜蛾微孢子蟲 (*Nosema* sp.) 為斜紋夜蛾主要病原體之一。1983 年發現於實驗室之飼養族群中 (徐, 1984)，並從事有關病理生物學之研究包括超微構造上的形態鑑定及感染劑量之定量化，同時將其命名為 *N. spodopterae* (徐, 1987; 徐等, 1992)。大約在同一時間，中國大陸亦發表了感染斜紋夜蛾之微孢子蟲新種，定名為 *N. lituræ* (李和問, 1987)。目前除斜紋夜蛾所分離到的微孢子蟲外，我們另外自四種不同鱗翅目寄主發現微孢子蟲的感染，分別為甜菜夜蛾 (*S. exigua*)、番茄夜蛾 (*Helicoverpa armigera*)、小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 和紋白蝶 (*Artogeia rapae crucivora* 和 *A. canidia sordida*)，希望能藉由生化和分子技術配合形態方面的資料，釐清不同分離株間彼此的關係。

貳、材料與方法

一、供試昆蟲之飼養

斜紋夜蛾以人工半合成飼料飼育於溫度 26 ± 2 °C，相對濕度 75 – 80%，12 小時光照之恆溫生長箱中。

二、微孢子蟲之分離株

斜紋夜蛾微孢子蟲為本實驗室所保有；甜菜夜蛾分離株由農業藥物毒物試驗

所提供之羅娜四代罹病甜菜夜蛾幼蟲分離而得；番茄夜蛾分離株為徐爾烈教授實驗室提供採集自花蓮田間之罹病幼蟲分離而得；小菜蛾分離株為中央研究院洪希奕博士所提供之罹病幼蟲所分離而得；紋白蝶分離株係由田間罹病紋白蝶幼蟲分離而得。

三、微孢子蟲孢子之純化

將病蟲經鏡檢確定後，將蟲體加入適量之 TE 緩衝液研磨，經四層之紗布過濾。濾液經 $150 \times g$ 低速離心 10 分鐘後，吸取上層液再經 $1,000 \times g$ 離心 20 分鐘後，將上層液體倒去，沈澱物以 TE 緩衝液再懸浮，並加入等體積之正己烷 (n-Hexane) 混合均勻，復經 $2,500 \times g$ 離心 20 分鐘，倒去上層液體並加入適量之 TE 緩衝液即為粗純化之微孢子蟲孢子。將上述粗純化之孢子以 90% Percoll® (Pharmacia) 為介質進行超高速離心，於 10°C ， $30,000 \times g$ 離心 30 分鐘後，近離心管底部之白色帶即為純化之孢子。收集純化的孢子以 TE 緩衝液沖洗 3 次，將沈澱以適量 TE 緩衝液回溶後存於 4°C 備用。

四、不同分離株之孢子增殖與對斜紋夜蛾第三齡幼蟲之致病力

各分離株除源自其原始寄主之孢子外，並以斜紋夜蛾為代用寄主進行不同分離株之孢子增殖。將不同分離株之純化孢子，以飼料表面污染法分別接種 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 孢子予斜紋夜蛾第三齡幼蟲 (約 5 日齡)。逐日觀察並記錄死亡情形。

五、孢子可溶性蛋白質的萃取

純化的孢子參考 Streett and Briggs (1982) 的方法，利用直徑 0.5 mm 之玻璃珠與孢子混合，以 Vortex-2 機器振盪 5 分鐘 (每振盪 1 分鐘後插於冰上 30 秒) 將大部分的孢子打破。於 4°C 經 $15,000 \times g$ 離心 5 分鐘後取上清液即為孢子可溶性蛋白質。以 BSA 1mg/ml 序列稀釋作為標準曲線，經 Hitachi U-2001 分光光度計測量 280 nm 波長之吸光值換算蛋白質之含量。

六、兔子抗斜紋夜蛾微孢子蟲可溶性蛋白質抗體之製備

將 1 mg/ml 之斜紋夜蛾微孢子蟲之可溶性蛋白質與等體積之弗氏完全佐劑 (Freund's complete adjuvant) 混合，完全乳化後以皮下注射法注入紐西蘭種雄兔體內，隔二星期後取同量之蛋白質與弗氏不完全佐劑 (Freund's imcomplet adjuvant) 混合作追加注射，共追加三次，最後一次追加注射完畢後隔週採血、離心，即得兔子抗斜紋夜蛾微孢子蟲之多元抗體。

七、免疫螢光偵測法

將不同來源之微孢子蟲孢子滴於載玻片上抹片，待其風乾後以磷酸緩衝液 (phosphate buffer saline, PBS, pH 7.2) 洗三次，每次 10 分鐘。隨後加入固定液 (甲醇：丙酮 = 1:1) 於室溫下固定 30 分鐘，再以 PBS 沖洗三次，每次 10 分鐘。用 1% BSA 於 37°C 下作用 1 小時，再加入一級抗體 (兔子抗斜紋夜蛾微孢子蟲) 於 37°C 下作用 1 小時。作用完畢以 PBS 沖洗三次，每次 10 分鐘，再用二級抗體 (conjugated anti-rabbit IgG fluorescent isothiocyanate, FITC) 於 37°C 下作用 1 小時，同樣以 PBS 洗三次，每次 10 分鐘。最後用 PBS：甘油 = 1:1 封片液封片，並以透明指甲油劃過蓋玻片周圍，待風乾後，避光存於 4°C ，以螢光顯微鏡觀察照像。

八、蛋白質電泳圖譜分析

孢子可溶性蛋白質加入樣本緩衝液 (含 SDS) 充分混合後，於 100 °C 水浴 5 分鐘，取 10 µl 進行聚丙烯醯胺膠體電泳 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)。電泳膠片的集合膠體 (stacking gel) 及分離膠體 (separating gel) 所含之聚丙烯醯胺濃度分別為 2.5% 和 12.5%。電泳膠片以銀染法 (silver stain) 或 Coomassie brilliant blue R-250 進行染色。

九、西方轉印法

可溶性蛋白質進行 SDS-PAGE 後，將蛋白質以半乾式蛋白質轉印法轉印至硝化纖維膜上，以 Tris-buffered saline (TBS, pH 7.5) 沖洗，再以含 3% 脫脂奶粉之 TBS 於 37 °C 下作用 1 小時，隨後加入 200 倍稀釋之一級抗體 (兔子抗斜紋夜蛾微孢子蟲) 於 37 °C 下作用 1 小時。作用完畢後以 TBST (TBS 含 0.05% 之 Tween 20) 沖洗三次，每次 10 分鐘；再以 2,500 倍稀釋之二級抗體 (goat anti-rabbit IgG conjugated horseradish peroxidase) 於 37 °C 下作用 1 小時，作用後以 TBST 沖洗三次，每次 10 分鐘。最後與呈色液 (含 60 mg 4-Chloro-1-naphtol, 20 ml 甲醇, 100 ml TBS, 60 µl 30% 過氧化氫溶液) 於室溫進行呈色反應。

十、微孢子蟲孢子之 DNA 萃取

不同分離株之純化孢子 5×10^8 個離心沈澱後，回溶於 0.5 ml 之 BBS 溶液 (0.5 M NaCl, 0.2 M Tris-HCl, 0.01 M EDTA, pH 7.5, 1% sodium N-lauroyl sarcosine) 加入 0.75 g 直徑 0.1 mm 之鋁珠 (zirconia/silica beads) 於 10 × 75 mm 之玻璃試管中以 Vortex-2 機器開至最強振盪 1 分鐘 (修改自 Undeen and Cockburn, 1989 的方法)，以相位差顯微鏡觀察孢子破裂的情形 (破裂者呈黑色，完整者呈折光性強之白色)。待大部分孢子破裂時，以黃色吸管尖頭吸取均質液利用 QIAamp Blood Mini Kit (QIAGEN) 進行 DNA 之萃取。

十一、SSUrRNA 基因序列

微孢子蟲 SSUrRNA 基因之引子為源自 Vossbrinck *et al.* (1993) 所設計之通用引子對 18f 與 1537r。PCR 總反應體積 100 µl，含有 100 ng 之基因體 DNA，50 mM KCl, 10 mM Tris (pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 mM dNTP, 0.1 µM primer 和 2.5 U Taq DNA polymerase (Promega) 於 200 µl 薄壁反應管中，以 AG-9600 溫度控制器進行反應。增幅條件為 94 °C 2 分鐘，40 循環之 94 °C 30 秒、50 °C 30 秒、72 °C 2 分鐘，最後延長 72 °C 7 分鐘。反應結束後取 10 µl 產物以 1% 瓊脂膠體進行電泳，於紫外光下觀察並拍照。將 PCR 產物轉殖入 pGEM-T Easy Vector System (Promega) 後進行質體之轉型作用。挑選白色菌落並將選殖 DNA 片段之雙股以自動 DNA 定序儀 (DNA Sequencer 377, Applied Biosystems) 定序。

十二、親緣關係之分析

根據 GenBank 中已發表源自鱗翅目寄主之微孢子蟲 SSUrRNA 序列較完整部分，以 Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) 程式進行序列排列比對，以 *Vavraia oncooperae* (accession no. X74112) 為外群。利用 GeneDoc 程式將檔案格式轉換為 phylip 檔案格式 (Nicholas *et al.*, 1997) 至 Macintosh 電腦中使用 PAUP* 4.0b8 (Swofford, 1998) 程式進行親緣關係分析 (phylogenetic analysis)。

十三、家蠶微粒子之專一性引子檢測

根據 Kawakami *et al.* (1994) 所發表檢測家蠶微粒子 (*Nosema bombycis*) putative pseudogene SSUrRNA 序列之專一性引子對 KAI01 和 KAI02 修改成 KAI01N 和 KAI02N 引子對 (將原本做為限制 切位之序列去除)。PCR 反應溶液如前所示。

十四、RAPD-PCR 分析

以商品化逢機引子組 OPA、OPAC、OPBD、OPO 和 OPU (Operon) 試劑組，每組 20 種引子 (附錄 A)。反應條件根據 Williams *et al.* (1990) 略加修改。將所增幅之電泳條帶予以數值化成為一方型矩陣資料，以 NTSYS-pc v. 2.01b 程式 (Rohlf, 1997)，利用 Jaccard 相似性係數和 UPGMA 方法繪出不同分離株間之關係圖型。

參、結 果

一、形態資料

所有的孢子皆呈卵圓形，五株分離株源於原始寄主之孢子大小分別為 $4.00 \pm 0.17 \times 1.90 \pm 0.12 \mu\text{m}$ (NS)、 $3.98 \pm 0.25 \times 1.90 \pm 0.12 \mu\text{m}$ (SE)、 $4.03 \pm 0.26 \times 1.89 \pm 0.14 \mu\text{m}$ (HA)、 $3.96 \pm 0.21 \times 1.88 \pm 0.10 \mu\text{m}$ (PX) 和 $4.01 \pm 0.21 \times 1.88 \pm 0.11 \mu\text{m}$ (AS)，以 Duncan's 多變域分析並無顯著性差異。

二、不同分離株對斜紋夜蛾第三齡幼蟲之感染力比較

三種不同接種劑量的死亡率，分別為 1×10^5 spores/larva 為 91.0% (HA) 至 100% (SE)、 1×10^4 spores/larva 為 60.0% (HA) 至 94.4% (SE)、 1×10^3 spores/larva 為 30.5% (HA) 至 47.46% (SE)。 1×10^5 spores/larva 感染劑量下，平均每隻幼蟲的孢子產量介於 10^7 至 10^9 個孢子，PX 分離株產量最高 (2.49×10^9 spores/larva) 而 SE 分離株之產量最低 (4.09×10^7 spores/larva)；感染後 6 日內為潛伏期 (latent period)，6-18 日為指數期 (exponential period)，18 日後為平原期 (stationary period)。所有分離株的感染曲線皆為 S 型 (sigmoid) (圖一)，其中 PX 分離株呈現延遲的現象；於感染 30 日後，所有分離株所造成的累積死亡率皆達 90% 以上。

五分離株之 LD_{50} 值從 1.10×10^3 (SE) 到 4.28×10^3 (HA) 不等，SE 分離株的數值約為 HA 分離株的 4 倍、PX 分離株之 3 倍，而和 NS 與 AS 株無顯著差異。若以 LT_{50} 計算，SE 的致死時間較其他株為快。

三、西方轉印法

主要的片段在 77.5 kDa 至 49 kDa 之間，另外兩片段為 44 kDa 和 26 kDa；次要的片段為 173、156 和 104 kDa。其中 NS 和 AS 的圖譜相似，均含有 7 條呈色帶：77.5、72、60.5、54、50.5、44 和 26 kDa。除了 65.5 kDa 呈色帶外，SE 和 HA 具有與 NS 和 AS 同樣的圖譜。PX 分離株具有 4 條獨特的片段 58、56、49 和 25.5 kDa。可將此五株分成 3 種血清型：NS/AS、SE/HA 和 PX。從血清型的關係可發現 NS/AS 和 SE/HA 分群較近而異於 PX 分離株。

四、SSUrRNA 基因序列和親緣關係分析

以 18f 和 1537r 引子對所增幅的 SSUrRNA 基因片段長度為 1,232 bp，其中 NS、SE、PX 和 AS 四株的序列完全相同 (GenBank accession no. AF238239)，而

HA 分離株的序列只有在距 5'端 821 位置將“A”換成“G”(GenBank accession no. AF238240)。

五、家蠶微粒子之專一性引子檢測

圖四為偵測家蠶微粒子之專一性引子對 KAI01N 和 KAI02N 以 PCR 增幅之結果，只有 PX 分離株有一 832 bp 片段產生 (GenBank accession no. AF310844)。此序列與家蠶微粒子之 SSUrRNA pseudogene 序列 (GenBank accession no. D14632) 僅 5'端第 48 位置有一鹼基的差異。

六、RAPD-PCR 分析

本研究中只有挑選可從基因組 DNA 中擴增出主要片段的引子，從五套引子組中選出 60 個引子做為分析之用。研究中所使用的 60 個可產生明顯片段的引子，以 Jaccard 相似性和 UPGMA 分析所產生的樹狀圖分成 3 群：NS/AS、SE/HA 和 PX。NS/AS 和 SE/HA 的群內相似度各為 93.5% 和 91%；而 NS/AS 和 SE/HA 的群間相似度為 78.8%；這兩群與 PX 的相似度只有 21.3%。PX 分離株與其他四株分離株明顯具有很大的差異；而其餘四株間的高相似度顯示其可能是屬於同一種或是兩個關係很近的種類。

肆、討 論

源自於五種不同鱗翅目寄主之微孢子蟲分離株均為蔬菜之重要害蟲，雖然棲所或寄主植物之偏好性有所不同，但經常可於田間發現其共存於同一寄主植物之情形。此外，目前所分離的微孢子蟲分離株均可以斜紋夜蛾為代用寄主，由於斜紋夜蛾蟲體較大，易於大量飼養，可做為未來大量生產之考量。

比較不同分離株對三齡斜紋夜蛾幼蟲之病原性，發現 SE 和 AS 分離株具有較高的毒力；但與 SE 同屬一血清型之 HA 分離株卻具有較低的毒力。然而具有較低的毒力的分離株卻可有較高的孢子產量，這是在致死時間上的差異所造成。由於毒力較高者，相對地蟲體較小，孢子產量較低；而毒力低者其致死時間延長，蟲體可發育至 5 齡以上，孢子產量 PX 分離株較 SE 分離株高出 60 倍以上。

從電子顯微鏡切片的形態構造觀察 (孢子具有雙核)，蛋白質電泳圖譜和 SSUrRNA 序列資料顯示，此五分離株應為 *Nosema* 屬是肯定的。另一方面，感染小菜蛾之微孢子蟲分離株曾被鑑定為 *Vairimorpha* sp. (Nahif and Jung, 1998) 和 *V. imperfecta* (Canning *et al.*, 1999a)。於馬來西亞一小菜蛾感染微孢子蟲的報告中則認為是家蠶微粒子 *N. bombycis* 所造成的感染 (Idris *et al.*, 1997)。由於一種昆蟲有可能被一種以上之微孢子蟲寄生的可能，例如家蠶在日本至少就分離出四種以上之微孢子蟲 (Hatakeyama *et al.*, 1997)，紋白蝶至少也有三種 (阿部和河原?，1998)；而不同昆蟲也有可能被同一種的微孢子蟲寄生。這個因素增加了對於種類鑑定的困難度。

根據我們西方轉印法和 RAPD-PCR 的結果顯示小菜蛾分離株是獨特的一分離株，且具有家蠶微粒子之專一性片段；但由於台灣並無家蠶微粒子病的報告，因此我們無法以我們所製備之抗血清和 RAPD 引子確認其與家蠶微粒子間的關係。本研究曾以 *N. spodopterae* 感染第二齡之家蠶，發現該分離株對家蠶並無病原性，此結果與 Watanabe (1976) 及李和問 (1987) 的報告相仿。而小菜蛾分離株對家蠶亦無法感染。因此，小菜蛾分離株與國外之分離株是否相同，以及其與家蠶微粒子的關係，仍有待將來進一步釐清。

分析 SSUrRNA 基因序列資料中，*Nosema* 屬之模式種 *N. bombycis* (accession no. D85503) 與我們所定序的資料並無顯著的不同。於整個 *Nosema* 群中是由 *N. bombycis* complex 和 *N. furnacalis* 所組成 (圖三)。*N. bombycis* complex 中除了家蠶微粒子外，*N. trichoplusiae*、*N. tyriae*、*Nosema* sp. Sd-NU-IW8401 和本研究中所定序之分離株，但亦包含了兩個分離自小菜蛾之 *Vairimorpha* 屬的種類 *V. imperfecta* 和 *Vairimorpha* sp. (Canning *et al.*, 1999a)。這是由於 SSUrRNA 基因為高保守性，在 *Nosema* 群的種類中僅有 33 個變異位置，可能是此一基因無法用以區辨關係相近之種類 (Canning *et al.*, 1999a)。

Pieniasek *et al.* (1996) 認為 SSUrRNA 序列上非常相近的種類 *N. trichoplusiae* 與 *N. bombycis* 應該是同一種，而如果兩者間在其他 rRNA 區域有所不同，則應視為亞種。然而，關於 *Nosema* 屬之其他 rRNA 區域之資料，僅有四個鱗翅目種類的 LSurRNA 片段 (300 bp 左右)，其中也包含模式種了 *N. bombycis* (Baker *et al.*, 1994)。然而，他們彼此間的序列相似程度仍相當高。

孢子是微孢子蟲生活史中唯一可大量純化的時期，因此許多的實驗均是以孢子來操作，由孢子抽取基因組 DNA 的方法也相當易於操作，有其實驗之便利性。RAPD-PCR 圖譜對於不同種間或同種間不同的個體均可選擇有效的引子加以鑑別。OPA-04 曾被用以區別來自不同寄主之 *Encephalitozoon* 屬的種類 (Mathis *et al.*, 1996; 1997)。本研究亦發現可用以區辨關係相近之不同分離株。

檢視以往的報告發現，利用單株抗體偵測微孢子蟲僅能確認到同一屬的種類，對於種的確認並無法有效地解決。同樣的情況發生在 SSUrRNA 序列資料，僅能提供對於同屬進行確認。但如同 *Nosema* 屬與 *Vairimorpha* 屬均具雙核的微孢子蟲種類其分類上的混亂情形而言，利用 SSUrRNA 序列資料至少可以增加判斷上的正確性。目前為止，並沒有任何基因可提供用對同一屬的微孢子蟲種類進行有效的區辨，而利用 RAPD-PCR 的技術協助處理近緣種的關係是可行的。雖然在不同種類之間其圖譜的相似度程度可能太低，用以做為親緣關係的分析可能是不適合的；換言之，形成低相似性圖譜的引子卻可用以鑑別不同的種類 (Ito and Yanagi, 1999)。

在 GenBank 中有兩個源自中國大陸海南海口之家蠶微粒子之 DNA 序列資料 (GenBank accession no. AF214921, 1,050 bp 和 AF214922, 1,097 bp)，檢視其序列首尾發現有 10 個鹼基序列是完全互補的，因此可能是以 RAPD-PCR 方式合成後定序的結果。由於並無任何的文獻可供查詢，我們亦嘗試以可能的引子行 RAPD-PCR 擴增。其中利用 S102 引子會產生一條約 300 bp 左右之片段，而 S108 引子會產生一條 850 bp 之片段，此二片段長度皆與海南海口之家蠶微粒子所形成之片段不同，間接證明了我們所收集之分離株應是不同於家蠶微粒子的種類。

本文以提及之資料及詳細的圖表已發表於無脊椎動物病理學期刊 (Journal of Invertebrate Pathology, 81, 51-59)。

伍、參考文獻

- 安永 智佐、舟越 正子、河原? 勇、荒武 義信、岩野 秀俊。1992。??? ?
???? 幼虫?? 分離??? 微孢子虫 *Nosema bombycis* (Microsporida:
Nosematidae)。應動昆 36: 127-134。
- 李社平、問錦曾。1987。斜紋夜蛾微孢子蟲一新種。中國農業科學 20: 71-74。
- 岡田 齊夫。1970。天敵微生物??? 牧草害虫? 防除。農業??? 園芸 45:
677-682。

- 徐泰浩、徐爾烈、嚴奉琰。1991。斜紋夜蛾微孢子蟲 *Nosema* sp. 孢子超微構造之研究。中華昆蟲 11: 242-251。
- 徐泰浩、徐爾烈、嚴奉琰。1992。斜紋夜盜微孢子蟲新種—*Nosema spodopterae* n. sp.。中華農學會報 157: 81-90。
- 徐泰浩。1987。斜紋夜盜微孢子蟲病病理生物學之研究。國立台灣大學植物病蟲害學研究所博士論文。171 頁。
- Al Fazairy, A. A. 1986. Natural microsporidian infection in laboratory colonies of *Spodoptera* spp. *Insect Sci. Appl.* 7: 701-705.
- Andreadis, T. G. 1985. Experimental transmission of a microsporidian pathogen from mosquitoes to an alternate copepod host. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 5574-5577.
- Baker, M. D., C. R. Vossbrinck, E. S. Didier, J. V. Maddox, and J. A. Shaddock. 1995. Small subunit ribosomal DNA phylogeny of various microsporidia with emphasis on AIDS related forms. *J. Eukaryot. Microbiol.* 42: 564-570.
- Baker, M. D., C. R. Vossbrinck, J. J. Bencel, and T. G. Andreadis. 1997. Phylogeny of *Amblyospora* (Microsporida: Amblyosporidae) and related genera based on small subunit ribosomal DNA data: a possible example of host parasite cospeciation. *J. Invertebr. Pathol.* 71: 199-206.
- Baker, M. D., C. R. Vossbrinck, J. V. Maddox, and A. H. Undeen. 1994. Phylogenetic relationships among *Vairimorpha* and *Nosema* species (Microsporida) based on ribosomal RNA sequence data. *J. Invertebr. Pathol.* 64: 100-106.
- Baldauf, S. L., A. J. Roger, I. Wenk-Siefert, and W. F. Doolittle. 2000. A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science* 290: 972-977.
- Bryan, R. T. 1995. Microsporidiosis as an AIDS-related opportunistic infection. *Clin. Infect. Dis.* 24: S62-S65.
- Canning, E. U. 1982. An evaluation of protozoal characteristics in relation to biological control of pests. *Parasitology* 84: 119-149.
- Curgy, J. J., J. Vavra, and C. Vivares. 1980. Presence of ribosomal RNAs with prokaryotic properties in Microsporidia, eukaryotic organisms. *Biol. Cell.* 38: 49-51.
- Hatakeyama, Y., Y. Kawakami, H. Iwano, T. Inoue, and R. Ishihara. 1997. Analyses and taxonomic inferences of small subunit ribosomal RNA sequences of five microsporidia pathogenic to the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.* 66: 242-252.
- Hazard, E. I., T. Fukuda, and J. J. Bencel. 1985. Gametogenesis and plasmogamy in certain species of microsporidia. *J. Invertebr. Pathol.* 46: 63-69.
- Henry, J. E. 1981. Natural and applied control of insects by protozoa. *Ann. Rev. Entomol.* 26: 49-73.
- Idris, A. B., B. A. H. Zainal-Abidin, and A. M. Norhayati. 1997. Detection of *Nosema bombycis* (Naegeli) in diamondback moth using Giemsa stain. *Malay. Appl. Biol.* 26: 105-107.
- Irby, W. S., Y. S. Huang, C. Y. Kawanishi, and W. M. Brooks. 1986. Immunoblot analysis of exospore polypeptides from some entomophilic microsporidia. *J. Protozool.*, 33: 14-20.
- Ishihara, R., and Y. Hayashi. 1968. Some properties of ribosomes from the sporoplasm of *Nosema bombycis*. *J. Invertebr. Pathol.* 11: 377-385.
- Ito, Y., and S. O. Yanagi. 1999. Discrimination of Basidiomycete species and strains by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis. *JARQ* 33: 149-154.

- Kawakami, Y., T. Inoue, K. Ito, K. Kitamizu, C. Hanawa, T. Ando, H. Iwano, and R. Ishihara. 1994. Identification of a chromosome harboring the small subunit ribosomal RNA gene of *Nosema bombycis*. *J. Invertebr. Pathol.* 64: 147-148.
- Kawakami, Y., T. Inoue, Y. Uchida, Y. Hatakeyame, H. Iwano, and R. Ishihara. 1995. Specific amplification of DNA from reference strains of *Nosema bombycis*. *J. Seric. Sci. Jpn.* 64: 165-172.
- Loxdale, H. D., and G. Lushai. 1998. Molecular markers in entomology. *Bull. Entomol. Res.* 88: 577-600.
- Malone, L. A., and C. A. McIvor. 1996. Use of nucleotide sequence data to identify a microsporidian pathogen of *Pieris rapae* (Lepidoptera, Pieridae). *J. Invertebr. Pathol.* 68: 231-238.
- Naegeli, K. W. 1857. Über die neue Krankheit der Seidenraupe und verwandte Organismen. *Bot. Ztg.* 15: 760-761.
- Nahif, A. A., and C. Jungen. 1998. Morphology and development of *Vairimorpha* spec. (Microsporida, Nosematidae) from diamondback moth *Plutella xylostella* (Lep., Yponomeutidae). *J. Appl. Ent.* 122: 617-621.
- Narayanan, K., and S. Jayaraj. 1979. Occurrence of mixed infections of virus and protozoa in two species of Lepidoptera. *Curr. Sci.* 48: 825.
- Olsen, G. J., and C. R. Woese. 1993. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB J.* 7: 113-123.
- Pieniasek, N. J., A. J. da Silva, S. B. Slemenda, G. S. Visvesvara, T. J. Kurtti, and C. Yasunaga. 1996. *Nosema trichoplusiae* is a synonym of *Nosema bombycis* based on the sequence of the small subunit ribosomal RNA coding region. *J. Invertebr. Pathol.* 67: 316-317.
- Sajap, A. S. 1995. A preliminary observation on microsporidian infection in the armyworm, *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae). *Malays. Appl. Biol.* 24: 43-48.
- Sprague, V. 1977. Classification and phylogeny of the microsporidia. *In: Bulla, L. A. Jr. & T. C. Cheng (eds.), Comparative Pathobiology. Systematics of the Microsporidia.* Plenum Press, New York. 2: 1-30.
- Swofford, D. L. 1998. PAUP*, Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods), version 4.0b4a, Sinaur Associates, Sunderland, MA.
- Tanada, Y., and H. K. Kaya. 1993. Protozoan infections: Apicomplexa, Microspora. *In: Insect Pathology, Academic Press, San Diego.* 414-458.
- Undeen, A. H., and A. F. Cockburn, 1989. The extraction of DNA from microsporidia spores. *J. Invertebr. Pathol.* 54: 132-133.
- Van de Peer, Y., A. B. Ali, and A. Meyer. 2000. Microsporidia: accumulating molecular evidence that a group of amitochondriate and suspectedly primitive eukaryotes are just curious fungi. *Gene* 246:1-8.
- Vossbrinck, C. R., M. D. Baker, E. S. Didier, B. A. Debrunner-Vossbrinck, and J. A. Shaddock. 1993. Ribosomal DNA sequences of *Encephalitozoon hellem* and *Encephalitozoon cuniculi*: species identification and phylogenetic construction. *J. Eukaryot. Micorbiol.* 40: 354-362.
- Watanabe, H. 1974. First report of the microsporidian infection of the cabbageworm, *Pieris rapae crucivora* Boisduval (Lepidoptera: Pieridae) in Japan. *Appl. Ent. Zool.* 9: 133-142.
- Watanabe, H. 1976. A *Nosema* species of the Egyptian cotton leafworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera): its morphology, development, host range, and taxonomy. *J. Invertebr. Pathol.* 28: 321-328.
- Weber, R., R. T. Bryan, D. A. Schwartz, and R. L. Owen. 1994. Human

microsporidial infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 7: 426-461.

Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.