

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫名稱：

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC 89-2313-B-002-

執行期間：民國 88 年 8 月 1 日至民國 89 年 7 月 31 日

計畫主持人：石正人

執行單位：國立台灣大學昆蟲學系

中華民國八十九年十二月四日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫中文名稱：

計畫英文名稱：

計畫編號：NSC 89-2313-B-002-

計畫主持人：石正人

計畫參與人員：饒筱芸、陳哲宏

執行期限：88/8/1-89/7/31

執行機構：國立台灣大學昆蟲學系

## 一、中文摘要

本論文以斜紋夜蛾核多角體病毒為主要研究對象，試選殖斜紋夜蛾核多角體病毒(*Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus, SpltNPV)對斜紋夜蛾幼蟲致病力高的基因，並利用基因重組的方法，將此影響寄主範圍的基因選殖到加州苜蓿夜蛾核多角體病毒(*Autographa californica* nucleopolyhedrovirus, AcMNPV)上，以提高重組病毒對斜紋夜蛾幼蟲的致病力，擴增 AcMNPV 之寄主範圍。首先利用 *EcoRI* 限制酵素切割 SpltNPV DNA，建立基因庫，進而選殖基因片段於 AcMNPV 病毒傳送載體(pFastBacHTa)上，共篩選到 13 種含有不同 DNA 片段之傳送載體。利用 Bac-to-Bac 表現系統，將斜紋夜蛾核多角體病毒 DNA *EcoRI* 限制酵素片段，隨機選殖到 AcMNPV 上，產生含有 SpltNPV DNA 片段之 AcMNPV 重組病毒。本試驗共構築八種含有不同限制酵素片段之不同重組病毒，利用包埋前病毒(pre-occluded virus)形式，餵食斜紋夜蛾一齡幼蟲，進行生物檢定，發現這八種重組病毒對幼蟲致病力皆不超過 30%，且八種重組病毒與野生型 AcMNPV 及無包涵體對一齡幼蟲之致病力，均無顯著差異。結果顯示能夠提高 AcMNPV 致病力之基因並未選殖至這八種重組病毒中。

關鍵詞：斜紋夜蛾核多角體病毒、加州苜蓿夜蛾核多角體病毒、寄主範圍

## Abstract

This study was based on the *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus (SpltNPV) to clone the gene which could increase pathogenicity to the larva of *S. litura*.

Furthermore, the gene related to the host range was incorporated to *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) by means of genetic engineering to generate recombinant virus. The recombinant virus was used to feed *S. litura* larvae for determining its the pathogenicity. First of all, the genomic library of SpltNPV was established by digesting DNA of SpltNPV with several restriction enzymes such as *EcoRI*. DNA fragments from established genomic library were cloned to the transfer vector pFastBacHTa of AcMNPV. Thirteen clones of recombinant transfer vector contained different *EcoRI* fragments of SpltNPV were obtained. These transfer vectors were used to generate recombinant AcMNPV by using Bac-to-Bac expression vector system. There were eight different recombinant viruses obtained. The pre-occluded form virus was used to bioassay 1<sup>st</sup> instar of *S. litura*. Results revealed that pathogenicity of 8 recombinant viruses were less than 30%, and there were no significant difference between recombinant viruses and wild type AcMNPV. This indicated that all recombinant viruses did not contain host range related gene of SpltNPV.

Key words: *Spodoptera litura*

nucleopolyhedrovirus, AcMNPV, host range

## 二、緣由與目的

昆蟲桿狀病毒可以感染500種以上之昆蟲，其中又以鱗翅目、膜翅目、雙翅目、及鞘翅目等為主要寄主，應用在蟲害防治已有多數歷史。但由於桿狀病毒之殺蟲作用慢及殺蟲範圍窄，使得桿狀病毒殺蟲劑無法普遍為農民所接受。因此增強桿狀病毒之致病力及擴增寄主範圍是當前主要克

服的研究重點之一（石及李，1998）。

目前利用基因工程改造桿狀病毒的試驗，大都以增強殺蟲效果為重點，然而擴增病毒之殺蟲範圍也是很重要的研究重點之一，其可使農民利用一種病毒同時防治田間多種害蟲，除可增加病毒殺蟲劑實用價值外，亦能提升產業界生產病毒殺蟲劑之意願。

一般而言，桿狀病毒不論是體內或體外培養，其寄主範圍都很狹窄(Kondo and Maeda, 1991)，大都僅能感染同一屬或同一科內的昆蟲（王等，1996）。因此引發研究人員的興趣。自從1993年 Maeda 等人首先發現了桿狀病毒寄主專一性有關的基因後，近五年來，研究控制寄主範圍的基因，已成為一個熱門的研究主題。關於桿狀病毒寄主範圍之研究，已經發現有三個基因，分別控制著不同桿狀病毒之寄主範圍，包括 DNA helicase gene (Maeda *et al.*, 1993)、apoptosis-inhibiting gene (Clem and Miller 1993) 及 host range factor gene (Thiem *et al.*, 1996)。

斜紋夜蛾(*Spodoptera. litura*)及小菜蛾(*Plutella xylostella*)為目前我國重要的兩大蔬菜害蟲，在田間實際利用病毒防治害蟲上，亟需尋找一個能同時感染此二種害蟲的病毒，畢其功於一役。苜蓿夜蛾核多角體病毒(*Autographa californica* nucleopolyhedrovirus, AcMNPV)在環境中穩定，對於小菜蛾的抗性品系依然有很高的致病力，且能在自然環境引發疫病，寄主範圍比較廣泛，可防治至少三十四種各屬於十二個不同科之鱗翅目害蟲（段等人，1997），是防治上一個不錯的選擇。然而AcMNPV對於斜紋夜蛾幼蟲之致病率甚低，因此若以AcMNPV作為病毒殺蟲劑，不能同時防治這兩大蔬菜害蟲，如此也降低了AcMNPV病毒殺蟲劑的應用價值。斜紋夜蛾核多角體病毒(*Spodoptera litura* nucleopolyherovirus, SpltNPV)，對於斜紋夜蛾幼蟲具有很高的致病力（石等，1995），但其寄主範圍非常狹窄，尤其對小菜蛾幾無致病力，因此應用在田間實際防治害蟲上無法同時防治小菜蛾。

本計畫擬以 SpltNPV 為研究重點，欲選殖 SpltNPV 對斜紋夜蛾幼蟲具有高致病力特性之基因。利用基因工程的方法，結合 AcMNPV 及 SpltNPV 個別對於這兩大蔬菜害蟲高致病力特性，以提高 AcMNPV 對斜紋夜蛾幼蟲的致病力，擴大 AcMNPV 之寄主範圍，使重組病毒能同時有效地防治小菜蛾及斜紋夜蛾。

### 三、結果與討論

#### (一)構築含 SpltNPV DNA 限制酵素片段之重組 AcMNPV

##### 1.構築重組傳送載體

本項試驗利用 Bac-to-Bac 桿狀病毒表現系統，欲將所有 SpltNPV DNA 限制酵素片段，選殖至表現系統中之傳送質體 pFastBacHTa 上。首先為建立 SpltNPV 之基因庫 (genomic library)，本試驗選用 *EcoRI* 將 SpltNPV DNA 切割成長度從 12 kb 至 1 kb，共約 21 個不同長短的片段分別依 SpltNPV *EcoRI* 核酸片段長短，依次將片段編號為 A V，以此建立 SpltNPV 之基因庫。

SpltNPV DNA 以 *EcoRI* 切割後，與經過 *EcoRI* 作用之 pFastBacHTa 傳送載體 DNA 混合，加入 T4 DNA ligase，進行黏合作用，隨機選殖 SpltNPV DNA *EcoRI* 片段至傳送載體 pFastBacHTa 上。經黏合作用之重組 pFastBacHTa DNA。經 *EcoRI* 限制酵素切割質體 DNA 後，與對照組（只含 pFastBacHTa 之 DNA）比較，從中鑑定並篩選含有 SpltNPV DNA *EcoRI* 片段之傳送載體。試驗結果，總共得到 116 個重組載體。

所得重組載體，利用 *EcoRI* 切割後，以膠體電泳分析後，與 SpltNPV DNA *EcoRI* 限制酵素片段比對，以確定重組傳送載體所含 SpltNPV 之 DNA 片段為哪一段。試驗結果，在這一百餘種重組傳送載體中，共篩選出 13 種含有不同 SpltNPV DNA 片段的重組傳送載體。根據選殖入的片段長度，分別命名為 pFBSIEf v。重組傳送載體經相互比對確定無誤後，分

別進行重組病毒之構築。

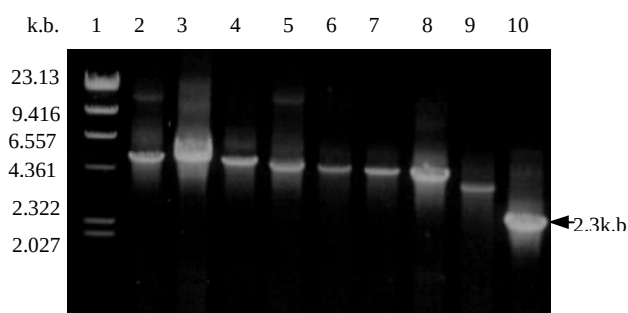
## 2. 重組病毒之構築

本試驗利用 Bac-to-Bac 系統因傳送載體 pFastBacHTa 具有 Tn7 的序列, Tn7 為 bacterial 的跳躍子(transposon), 而在大腸桿菌 DH10Bac 品系中, 也具有以 AcMNPV DNA 為主體之質體 Bacmid (bMON14272), 其上也具有 *att*-Tn7 序列。利用 transposition 的方式, 傳送載體 pFastBacHTa 上所選殖之片段有機會跳到大腸桿菌 Bacmid 中, 進而構築成重組 AcMNPV。目前已得到 8 種重組 AcMNPV。八種重組病毒所選殖上之 DNA 片段大小介於 1-3 kb 之間。

## 3. 重組病毒 DNA 之鑑定

在 Bacmid 上, 於插入片段之上下游區域, 設計有與 pUC/M13 amplification primers 能互補之序列, 因此可利用 PCR 方法, 鑑定出 Bacmid 是否經過重組及插入的外來 DNA 片段長度。

圖一所示為八種重組 Bacmid 經 PCR 增幅, 並以膠體電泳分析 PCR 產物。圖中最右邊為對照組, 即重組病毒僅以未經重組之 pFastBacHTa 進行 transposition 後之 Bacmid, 所增幅之片段長度約為 2.3 kb。而 SpltNPV 之 *Eco*RI-V 片段約為 1kb 重組載體 pBSIE-V 進行 transposition 之重組病毒, 所增幅之片段長度應為 3.3 kb; 其餘之重組病毒所增幅片段也較原插入片段增長約 2.3 kb。



圖一、利用 PCR 反應鑑定重組病毒所含之插入 DNA 片段長度。

Fig. 1. Length of DNA fragments of recombinant virus containing foreign insertion identified by PCR analysis.

Land 1.  $\lambda$  / *Hind*III DNA marker.  
Land 2. vAcBSIEO. Land 3. vAcBSIEP. Land 4. vAcBSIEQ. Land 5. vAcBSIER. Land 6. vAcBSIES. Land 7. vAcBSIET. Land 8. vAcBSIEU. Land 9. vAcBSIEV. Land 10. vAcBb.

## 4. 病毒之致病力

pFastBacHTa 所插入的片段是位於 *polh* 基因之啟動子之後, 因此所得之重組病毒, 不具 *polh* 基因之結構基因, 不會產生包涵體, 因此本試驗採用 Wood *et al.* (1993)的方法, 以 preoccluded virion 來測試重組病毒之致病力。

重組病毒對斜紋夜蛾幼蟲之致病力如表一所示。野生型 AcMNPV 以 POV 的病毒形式感染斜紋夜蛾一齡幼蟲, 作為對照組。其致病力為 15.7%  $\pm$  4.97; 而不含 SpltNPV DNA 片段之重組病毒 vAcBb, 是由未經重組之 pFastBacHTa 質體, 經由 transposition 的過程而得, 作為對照組。其致病力為 24.46%  $\pm$  6.10, 與野生型 AcMNPV 病毒相比, 無顯著差異。而含有 SpltNPV DNA 片段之重組病毒 vAcBSIEO 與 vAcBSIES<sub>1</sub>, 其致病力分別為 26.50%  $\pm$  5.92 及 26.18%  $\pm$  13.71。雖然致病力高於野生型 AcMNPV, 可是卻與 vAcBb 的致病力無顯著差異。

重組病毒 vAcBSIET<sub>1</sub>、vAcBSIEU<sub>3</sub> 及 vAcBSIEU<sub>4</sub> 等, 其致病力均與野生型 AcMNPV 無顯著差異。此外, vAcBSIEP、vAcBSIEQ、vAcBSIEU<sub>2</sub>、vAcBSIEV<sub>8</sub> 及 vAcBSIEV<sub>10</sub>, 其致病力則與空白組(只餵食水)無顯著差異。但將相同的重組病毒感染 SL7B 細胞, 五天後細胞都有破裂的情況, 表示重組病毒對細胞具有致病力。出現致病力降低的情形, 除了可能是因為在處理或保存病毒 POV 的過程中, 造成病毒活性降低外, 重組病毒可能對於蟲體的感染力較低。

表一、斜紋夜蛾初齡幼蟲餵食不同種類之重組核多角體病毒之死亡率

Table 1. Mortality of *Spodoptera litura* 1st instar infected with different recombinant viruses

| NPV                    | Mortality (%)± S.D. |     |
|------------------------|---------------------|-----|
| AcMNPV                 | 15.7 ± 4.97         | bc  |
| vAcBb                  | 24.46 ± 6.10        | ab  |
| vAcBSIEO               | 26.50 ± 5.92        | a   |
| vAcBSIEP               | 3.37 ± 2.78         | ef  |
| vAcBSIEQ               | 3.94 ± 1.16         | def |
| vAcBSIES <sub>1</sub>  | 26.18 ± 13.71       | a   |
| vAcBSIET <sub>1</sub>  | 7.81 ± 2.32         | cde |
| vAcBSIEU <sub>2</sub>  | 4.91 ± 1.28         | def |
| vAcBSIEU <sub>3</sub>  | 23.46 ± 5.30        | ab  |
| vAcBSIEU <sub>4</sub>  | 13.60 ± 3.08        | cd  |
| vAcBSIEV <sub>8</sub>  | 4.74 ± 3.48         | def |
| vAcBSIEV <sub>10</sub> | 6.05 ± 2.18         | def |
| H <sub>2</sub> O       | 0                   | f   |

Means followed by different letters within a column are significantly different at P<0.05

#### 四、計畫結果自評：

本試驗之結果，雖然所構築之重組病毒皆不能很明顯的提高對斜紋夜蛾幼蟲之致病力，未能達到預期成果。顯示可能此種基因位於其他未構築成重組病毒之 DNA 片段中，或者斜紋夜蛾核多角體病毒對斜紋夜蛾幼蟲致病力高的表現，為多種基因共同調控之結果。亦或者 SpltNPV 的基因無法在 AcMNPV 的感染系統中正常表現，但這一方面之推測，試驗還需將所有 DNA 片段都經過相同方式重組成重組病毒，測定其對於幼蟲致病力是否有明顯的增加後，方能下判斷。

#### 五、參考資料：

- 王重雄、蔡璧妃、蔡恕仁。1996。昆蟲桿狀病毒殺蟲劑之研究：生物技術之應用。台灣省農業試驗所特刊第五十七號，植物保護新科技研討會。193-202 頁。
- 石正人、李淑增。1998。斜紋夜蛾核多角體病毒化學增效作用之研究。中華昆蟲 18: 273-283。
- 石正人。1995。斜紋夜蛾幼蟲齡期之判別

及有效積溫之測定。臺灣大學農學院研究報告 35: 393-400。

段淑人、高穗生、趙裕展、侯豐男。1997。加州苜蓿夜蛾核多角體病毒對台灣九種鱗翅目害蟲之致病力。中華昆蟲 17: 209-225。

Clem, R. J., and L. K. Miller. 1993. Apoptosis reduces both the *in vitro* replication and the *in vivo* infectivity of a baculovirus. J. Virol. 67: 3730-3738.

Kondo, A., and S. Maeda. 1991. Host range expansion by recombination of the baculoviruses *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus and *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. J. Virol. 65: 3625-3632.

Maeda, S., S. G. Kamita, and A. Kondo. 1993. Host range expansion of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (NPV) following recombination of a 0.6-kilobase-pair DNA fragment originating from *Bombyx mori* NPV. J. Virol. 67: 6234-6238.

Thiem, S. M., X. Du, M. E. Ouentin, and M. M. Berner. 1996. Identification of a baculovirus gene that promotes *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus replication in a non-permissive insect cell line. J. Virol. 70: 2221-2229.

Wood, H. A., K. M. Trotter, T. R. Davis, and P. R. Hughes. 1993. Per os infectivity of preoccluded virions from polyhedrin-minus recombinant baculoviruses. J. Invertebr. Pathol. 62: 64-67.