

行政院國家科學委員會專題研究計畫期末報告

黑角舞蛾核多角體病毒之研究 (3/3)

The study of *Lymantria xylinea* nucleopolyhedrovirus (3/3)

計畫類別： ☒ 個別型計畫 ☐ 整合型計畫

計畫編號： NSC 89 - 2313 - B - 002 - 014

執行期限： 88 年 08 月 01 日 ~ 89 年 07 月 31 日

主持人： 王重雄 教授

處理方式： ☐ 對外提供參考

☐ 一年後可對外提供參考

☒ 不可對外提供參考

執行單位： 國立台灣大學昆蟲學系

中華民國八十九年九月十一日

行政院國家科學委員會專題研究計畫期末報告

黑角舞蛾核多角體病毒之研究 (3/3)

The study of *Lymantria xylin* nucleopolyhedrovirus (3/3)

計畫編號：NSC 89-2313-B-002-014

研究期間：88年08月01日~89年07月30日

計畫主持人：王重雄教授

一、中文摘要

核多角體病毒 (nucleopolyhedro- virus, NPV) 的基因中與寄主域相關的基因包括(1) *p10*, (2) *iap*, (3) *hel*, (4) *gp64*, (5) *p39*, (6) *polh*, (7) *p10*, (8) *hrf* 等。*p35* 及 *iap* 之產物作用於防止細胞計畫性的凋亡 (apoptosis)；*hel* 與去氧核糖核酸的複製相關；*gp64* 則為形成桿狀病毒構造—胞外病毒(ECV) 端體 (peplomer) 之基因；*p39* 產物為鞘蛋白之主要成份；*polh* 形成封埋型病毒 (OV) 之主要基質蛋白—多角體蛋白 (Polyhedrin)；*p10* 為非必要基因，影響感染細胞之分解；*hrf* 是近年來發現之新基因，於重組實驗中，證實可改變病毒之寄主域。基於榕樹透翅毒蛾和黑角舞蛾核多角體病毒(PenuNPV and LyxyNPV) 體外感染試驗結果，二者呈現有趣的寄主域差別，本年度研究重點在於 *gp64*、*hel* 和 *polh*。本報告中，我們闡述此三基因之篩選、定序的結果，在第三年的工作上，我們完成榕樹透翅毒蛾和黑角舞蛾核多角體病毒之此三基因全部定序、表現時序以及在寄主域上所扮演的角色。

二、英文摘要

The genes of nucleopolyhedro- virus (NPV) concerning host range include: (1) *p10*, (2) *iap*, (3) *hel*, (4) *gp64*, (5) *p39*, (6) *polh*, (7) *p10*, (8) *hrf* etc. The products of *p35* and *iap* are used to inhibit apoptosis, and *hel* is responsible for the replication of viral DNA. The *gp64*, *p39* and *polyhedrin* are viral structural proteins forming peplomer of extra cellular virus (ECV), capsid, and polyhedron respectively. The *p10* is a nonessential gene concerning cell lysis, and *hrf* is a host range gene. Based on *in vitro* infection test of PenuNPV and LyxyNPV, they showed an interesting host range difference. In this report, we described the results of clones and sequences of the three genes (*gp64*, *hel*, and *polh*) from two

NPVs. In the third year, we had carried out the whole sequences of these genes from two NPVs and discussed the time course of expression and their roles on host range.

三、計畫緣由與目的

黑角舞蛾 (*Lymantria xylin* Swinhoe) 隸屬毒蛾科 (Lymantriidae) 種類，又稱木毒蛾、木麻黃舞蛾、相思樹舞蛾。於1903年由 Charles Swinhoe 以其雄蛾訂其學名，模式標本採於台灣，分佈地區包括了台灣、日本、印度及大陸福建、廣東等地，最早由楚南仁博 (1936) 記錄了黑角舞蛾在台灣危害相思樹與木麻黃。

雄成蟲體長16~25mm，翅呈灰白色長約24~30mm，前翅前緣近頂角處具三黑點，前翅中具橫線且外橫線明顯而內橫線有部份消失，前、中足脛節密佈白色長鱗毛，腹部背面披有白色鱗毛，具黑色羽狀觸角；雌成蟲頭頂具紅色及白色長鱗毛，體長23~33mm，翅呈黃白色長約30~40mm，前翅中內橫線僅在前緣處明顯，外橫線寬而呈灰棕色，前翅及後翅翅緣均具7~8個近方形的灰棕斑，足具黑色鱗毛，僅基節端部及腿節外側具紅色鱗毛，中、後足脛節各含2個距，腹部密佈黑色鱗毛，僅第一至第四節背板後半部及側面具紅色鱗毛。

在台灣，黑角舞蛾為木麻黃防風林的主要害蟲，由 Huang and Tsay (1998) 針對黑角舞蛾的調查中發現，雌蛾喜卵塊於株高2公尺以下的枝條，卵塊似山丘形狀，覆有黃褐色雌蛾鱗毛，其平均卵粒數為400~500粒。本蟲以卵內胚胎發育成幼蟲型式而長期休眠，直至次年3月上旬陸續孵化。初孵化幼蟲群聚在卵塊表面，經過一至數天後，或爬離卵塊，或藉由吐絲方式隨風擴散至其他植株上，3齡以後之幼蟲漸自植株上分散危害，隨著齡期增加，

攝食量即越大，幼蟲約為7齡，唯有少數幼蟲個體為6或8齡，幼蟲期長達1.5至2個月之久。該蟲主要以幼蟲期在3至5月啃食葉片，發生猖獗時可將整片林木葉片啃食殆盡，成為光禿、蕭條景象；使林木生長劣變，如枝條凋萎、整株枯死。4月下旬至5月下旬間，老熟幼蟲會在枝條上、支幹分叉處及樹枝上開始吐絲並藉由臀棘鉤固定蛹體，蛹期約1至2週。成蟲於5月初間開始羽化，壽命約1週左右。

1903年台灣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、1935、1983、1984、1995及1996年 (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月上旬至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驅勢，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乎視，對此蛾的防治亦是刻不容緩。

根據大陸對罹患核多角病的黑角舞蛾所作的研究當中指出，黑角舞蛾幼蟲在感病的初期會有食慾減退、行動遲緩、體表失去光澤、死亡前一天停止取食等現象。而死蟲以尾足倒掛或以腹足呈“Λ”形吊掛於樹枝。死蟲之組織液化，表皮脆弱易破，溢出乳白色略帶腥味的濃液。且由前人的研究中可知 (Huang *et al.*, 1998)，黑角舞蛾會在五月份普遍有病毒流行病的發生，但病毒感染時間略遲。而黑角舞蛾同屬之另一種類吉普賽舞蛾 (*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，對吉普賽舞蛾的基本生物學防治，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—吉普賽舞蛾核多角體病毒 (*L. dispar* NPV; LdMNPV) 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)。黑角舞蛾與吉普賽舞蛾屬相近種類，大陸已發現有罹患核多角病的黑角舞蛾的個體 (Xia, 1991)，其病原體並經証實是屬桿狀病毒科 (Baculoviridae) 之核多角體病毒 (nucleopolyhedrovirus; NPV)，並命名為黑角舞蛾核多角體病毒 (LyxyNPV) (Liang *et al.*,

1986)。由調查台灣各處黑角舞蛾蟲體之死亡情況得知，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吉普賽舞蛾核多角體病毒以為有效的微生物殺蟲劑是預期可待。但是對此病毒的特性，大量增殖以及應用研究皆均闕如。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。本研究主要重點除訂定黑角舞蛾核多角體病毒的特性以及重要基因定序外，並調查病毒在野外之自然感染率，並與吉普賽舞蛾核多角體病毒作類比，建立其體外增殖系統，且篩選病毒株，並做各病毒株之特性鑑定，以為將來防治之用。

黑角舞蛾 (*L. xyliana*) 是近年來危害台灣防風林之主要害蟲，從罹患核多角體病之幼蟲分離出黑角舞蛾核多角體病毒，從此病毒進行形態特徵及生化特性等資料及體外增殖系統之建立。黑角舞蛾核多角體病毒屬典型之核多角體病毒，具被膜呈桿狀。比較由蟲體分離的黑角舞蛾核多角體與吉普賽舞蛾核多角體之主要蛋白質圖譜，二者在主要蛋白質帶上極為相似。但黑角舞蛾核多角體病毒基因組之限制酶圖譜與已報導之吉普賽舞蛾核多角體病毒基因組之限制酶圖譜完全不同。分別由台北 (台灣北部)、嘉義 (台灣南部) 及金門 (外島) 收集到之黑角舞蛾核多角體病毒，經蛋白質及DNA限制酶圖譜分析後發現，台灣黑角舞蛾核多角體病毒皆相同，並無變異。黑角舞蛾核多角體病毒之體外增殖系統已成功建立，只有 IPLB-LD-652Y 細胞株能接受此病毒並呈典型多角體病變 (Yu *et al.*, 1998)。本文擬以採自台灣地區罹患核多角體病變之黑角舞蛾，分離及純化其病毒，藉由分析相關蛾類基因之高保守片段設計引子，再由聚合酶鏈反應 (PCR) 增幅出病毒解螺旋基因 (*hel*)、64kDa 糖蛋白基因 (*gp64*)、以及多角體蛋白基因 (*polh*) 之片段，並由此增幅片段以南氏轉印法 (Southern blotting) 篩選出含此三基因之限制酶切割片段，以推測基因位置並進行基因之選殖與定序，並同時進行榕樹透翅毒蛾核多角體病毒 (PenuNPV) 相關基因之選殖與定序，藉由分析結果與黃杉毒蛾核多角體病毒 (OpMNPV)、舞毒蛾核多角體病毒之基因序列，期能更進一步對於影響昆蟲桿狀病毒寄主域之基因做研究，以瞭解影響毒蛾間寄主域差異之因子。

四、結果

1. 胞外病毒之感染效價及吸附係數

黑角舞蛾核多角體病毒株 (c782 株) 和榕樹透翅毒蛾核多角體病毒株 (θ 株) 各自分

別對於舞毒蛾細胞 (IPLB-LD-652Y) 和榕樹透翅毒蛾細胞株 (NTU-PN-HH) 的感染試驗中，榕樹透翅毒蛾與舞毒蛾細胞株皆為 θ 株的可接受細胞株 (permissive cell lines)；但 c782 株感染榕樹透翅毒蛾細胞株時，未呈現典型核多角體病變。將感染三天後的胞外病毒分別感染其同源細胞株 (θ 感染 PN 細胞， θ /PN) 或感染其近緣細胞株 (c782 感染 LD 細胞，c782/LD)，藉由 TCID₅₀ 計算以表示其胞外病毒感染效價作為產生子病毒之依據，而利用胞外病毒貼附細胞前後之數值比以作病毒貼附細胞之能力評估。

病毒感染其同源細胞 (θ /PN) 及近源細胞 (c782/LD) 之感染效價，分別皆高達 10^9 PFU/ml 以上；但對異源細胞的感染 (θ /LD)，其效價呈現較低值 (5.03×10^5)。相對地，c782/PN 則無子病毒的產生。

黑角舞蛾核多角體病毒株感染舞毒蛾細胞株和榕樹透翅毒蛾核多角體病毒株感染榕樹透翅毒蛾細胞株時具有高貼附值。病毒 θ 對同源及可接受性細胞株 (θ /PN 及 θ /LD) 之吸附係數分別各為 98.6 和 63.4，而 c782 病毒對兩種

2. 免疫螢光偵測

以兩種病毒感染細胞，共分成 4 組：c782/LD, c782/PN 及 θ /LD, θ /PN，細胞被感染 24, 48, 72, 96, 120hr 後，藉由製備的兔子抗病毒血清 (Ab_{lyxy} 及 Ab_{penu}) 的作用。以未感染的細胞為負反應對照組與病毒在細胞內增殖的結果作比較。

I. c782 / LD

感染 24hr 後，可見 LD 細胞之細胞質呈陽性反應，至 48hr 後擴及細胞核，同時細胞之胞核對 Evans blue 反應很弱，然而至 72hr 時則正反應有趨弱之現象。此現象延至感染 96hr 後，在感染 120hr 後，又呈現強烈正反應訊號及微弱之 Evans blue 反應。

II. c782 / PN

感染 48hr 以後，細胞正反應訊號微弱，至 72hr 開始增強，但反應僅侷限於細胞質中，至 96hr 反應則趨弱，並且細胞數目增多；至 120hr 正反應僅能見於細胞質內，並未呈均質狀。

III. θ / LD

感染後至 48hr，呈現相同的微弱正反應，只在感染的 LD 細胞之細胞質內只有局部性的

正反應。72hr 後細胞質內有正反應訊號有散佈胞質內的現象，至 96hr 後只有少部份細胞呈強烈正反應訊號。

IV. θ / PN

感染 24hr 後即可見強烈正反應訊號，但 48~96hr 皆呈正反應，有趨弱現象且正反應只呈現在細胞質中，細胞核內未見明顯的抗體反應。至 120hr 所有細胞均呈均質狀的正反應。

3. hel 和 gp64 基因之定序

利用設計的引子成功地擴增出兩種病毒 (LyxyNPV 和 PenuNPV) 的解螺旋酶 (hel) 和 64 kD 醣蛋白 (gp64) 片段，其大小如預估的結果：LyxyNPV 之 hel 片段約為 900 bp，gp64 片段約為 1000bp；PenuNPV 之 hel 片段約為 1200 bp，gp64 片段約為 1200 bp。以此產物為探針與 LyxyNPV 和 PenuNPV 之限制酶切割片段進行雜合反應，確定基因之位置；基因的選殖，採用 LyxyNPV 之 BamHI 及 PenuNPV 之 EcoRI 所建立的基因庫，藉由 PCR 的篩選分別獲得含 LyxyNPV hel 和 gp64 之 BamHI A 和 B 片段的質體，其大小分別為 14,000 bp 和 13,500 bp，PenuNPV hel 和 gp64 之 EcoRI A 和 D 片段的質體，其大小分別為 12,000 bp 和 9,000 bp，以作為定序及其他研究之用。

4. 基因序列與分析

兩病毒之 hel 與 gp64 經定序後，分別藉由分析軟體分析其基因全長和轉錄出之胺基酸序列，LyxyNPV hel DNA 序列全長 3646 bp，轉錄的胺基酸序列預估為 1215 a.a；PenuNPV hel DNA 序列全長 3671 bp，轉錄的胺基酸序列預估為 1223 a.a；LyxyNPV gp64DNA 序列全長 2064 bp，轉錄的胺基酸序列預估為 688 a.a；PenuNPV gp64 DNA 序列全長 1817 bp，轉錄的胺基酸序列預估為 605 a.a。

黑角舞蛾和榕樹透翅毒蛾核多角體相互間 (PenuNPV / LyxyNPV) 之 DNA 相似度分別就 DNA 序列和胺基酸序列作比較，hel DNA 序列間相似度為 51%，hel 胺基酸序列間相似度為 12%。至於與近緣病毒之比較，在 hel DNA 序列相似度上，LyxyNPV / LdMNPV 為 96%，PenuNPV / OpMNPV 為 97%；在 hel 胺基酸序列相似度上，LyxyNPV / LdMNPV 為 71%，PenuNPV / OpMNPV 為 27%。gp64 DNA 序列間 (PenuNPV / LyxyNPV) 相似度為

35%；gp64 胺基酸序列間相似度為 9%。與近緣病毒之比較，在 gp64 DNA 序列相似度上，LyxyNPV / LdMNPV 為 91%，PenuNPV / OpMNPV 為 92%；在 gp64 胺基酸序列相似度上，LyxyNPV / LdMNPV 為 36%，PenuNPV / OpMNPV 為 61%。

Ahrens 和 Rohman (1996) 研究 AcMNPV 和 OpMNPV 之 *hel* 序列，Kamita 和 Maeda (1997) 研究 BmNPV *hel* 序列，推估其啟動子序列 (promotor sequence) 和轉錄起始位 (transcription initiation site)，二者又因作用之先後，而有初期啟動子序列 (early promotor sequence) 和晚期啟動子序列 (late promotor sequence)。其序列分別為：

- early promotor sequence — TAATAA (TATA box)
- late promotor sequence — G/T TAAG
- transcription initiation site — GCGTGCT

LyxyNPV *hel* 之初期啟動子序列 (early promotor sequence, TAATAA 稱之為 TATA Box) 位在 -107，晚期啟動子序列 (late promotor sequence, G/T TAAG) 位在 -91。PenuNPV *hel* 之 TATA Box 位在 -180，G/T TAAG 位在 -73，而轉錄起始點位在 -110。PenuNPV gp64 之 TATA Box 位在 -198，G/T TAAG 位在 -153。

LyxyNPV *hel* 和 LdMNPV *hel* 之 ORF 的核酸序列而言，相似度高達 96%，不僅如此，其於 promoter 至 start codon 之序列亦十分相似，其 TATA 位在 -107，位置相似且序列相同，而 late promotor sequence (GTAAG) 結果亦如前者位在 -91。但若以胺基酸序列而言，二病毒之差異有 71% 之多。

PenuNPV *hel* 具有如同 OpMNPV *hel* 般之 promoter sequence (TAATAA, TTAAG) 及 transcription initiation site (GCGTGCT)，promoter 至 start codon 之間序列亦相同，故就此一基因而言，此二核多角體病毒除基因內相似度高外，基因本體至 promoter 之序列相似度亦極相似。

5. RT-PCR

以兩種病毒感染細胞，共分成 4 組：c782/LD, c782/PN 及 θ /LD, θ /PN。細胞被感染 24, 48, 72, 96, 120hr 後，收取感染細胞並抽取其 RNA 之後，隨即進行 RT-PCR 擴增，c782/LD 及 c782/PN 分別於 gp64 和 *hel* 偵測下均無反應。 θ /LD 及 θ /PN 分別於 gp64 和 *hel* 偵測下均有符合預測長度之反應產物 (1kb)，其

中於 gp64 偵測下， θ /LD 及 θ /PN 均於感染後 72~120hr 具有反應產物；於 *hel* 偵測下， θ /LD 於感染後 120hr 具有反應產物， θ /PN 於感染後 72~96hr 具有反應產物，為其量均少。對照組實驗亦分別比較於 gp64 和 *hel* 下之差異，細胞不感染病毒情況下，無法偵測到 gp64 之訊號，但在 LD 細胞下卻可見 *hel* 經 RT-PCR 擴增後，具有長約 1300 bp 之反應產物。

6. 親緣關係

藉由分析軟體以 Neighbor-Joining 的方式計算 bootstrap 值並繪出親緣分支樹：

I. gp64 基因

由基因銀行整理出 NPVs 的 gp64 基因 DNA 序列為參數，在 7 種 NPVs — AcMNPV, BmNPV, EpNPV, LdMNPV, LyxyNPV, OpMNPV, PenuNPV 間分析，結果如下：AcMNPV / BmNPV, LdMNPV / LyxyNPV 及 OpMNPV / PenuNPV 之 bootstrap 值皆分別為 1000，其分屬同一群。LdMNPV / LyxyNPV 群和 BmNPV / AcMNPV 群為近緣群；EpNPV 則屬獨立的病毒株。

II. 解螺旋酶基因

由基因銀行整理出 NPVs 之解螺旋酶基因 DNA 序列，並以其為參數，共分析 7 種 NPVs — AcMNPV, BmNPV, LdMNPV, LyxyNPV, OpMNPV, PenuNPV, SeMNPV 中，結果如下：LdMNPV / LyxyNPV, AcMNPV / BmNPV 以及 PenuNPV / OpMNPV 之 bootstrap 值皆分別為 1000，各屬同群。另外 AcMNPV / BmNPV 和 PenuNPV / OpMNPV 群間之 bootstrap 值為 1000，屬近緣群。SeMNPV 則為較獨立之病毒株。

7. 多角體蛋白基因 (*polh*) 之選殖與定序

PenuNPV 之 *polh* 基因的研究報導已由本實驗室發表 (Chou et al., 1996)，本文就不再詳述。至於 LyxyNPV 之 *polh* 基因，藉由南氏轉印法證實位於病毒基因體之 *Bam* HI-E (16.7 kbp)，*Eco* RI-D (16.7 kbp)，*Eco* RV-L (4.3 kbp) 和 *Kpn* I-C (19.6 kbp) 片段內。將 *Eco* RV-L (4.3 kbp) 片段選殖並且定序後，確定其內包含有 5 個可譯區 (open reading frame, ORF)，其中 ORF-2 即為 *polh* 基因，是由 735 核苷酸序列組成，可轉譯出具有 245 個胺基酸片段。多數桿狀病毒後期表現基因轉錄 (transcription) 有關之保守序列-TAAG-位在此基因的轉譯起始點 (translation start codon) 上游序列 53 核

甘酸的距離，而在蛋白質轉譯終點 (termination codon, TAA) 緊接著有 AATAAA 的序列，推測此為加聚腺嘌呤信號 (polyadenylation signal) 的位置。比較已發表的毒蛾科桿狀病毒之多角體蛋白的基因序列和胺基酸序列，發現 LyxyNPV 多角體蛋白與 LdMNPV 多角體蛋白之親源性最近。

五、討論

影響核多角體病毒寄主域之因素相當多，其中相關的基因有 *hel*, *gp64*, *hlf-1* 等。本論文則選擇其中兩個基因 (*hel*, *gp64*)，研究其對榕樹透翅毒蛾與黑角舞蛾核多角體病毒 (PenuNPV and LyxyNPV) 之寄主域影響的初步研究。此二病毒之體外增殖實驗中，Yu et al. (1998) 發現 PenuNPV θ 株能在 PN 及 LD 細胞內增殖並產生典型的核多角體病變，但 LyxyNPV c782 株則只能在 LD 細胞內增殖，對 PN 細胞並未呈現明顯細胞病變。再者， θ /PN 與 c782/LD 之子病毒皆呈高病毒效價，而從 θ /LD 與 θ /PN 之子病毒對 PN 細胞之效價相差只約 10 倍之結果，可見 θ 能在 LD 細胞內成功地複製其子病毒，即 PenuNPV θ 株之基因顯然可在此二細胞內充分表現，但 c782/PN 則並無子病毒的產生，表示了 c782 未能在 PN 細胞內成功地進行感染或複製之機制。

核多角體病毒在細胞內進行的複製過程具雙相的特性。早期複製產生胞外病毒，後期產生封埋性病毒，胞外病毒之前端被膜上具有 GP64 之病毒端體，以作為在蟲體血腔內、細胞間傳染時與細胞膜上受器結合後，藉由胞飲作用進入細胞內，而封埋性病毒則於中腸內，因多角體被溶解而釋出，以其由核衍生之被膜與中腸細胞之胞膜癒合而使核蛋白質鞘進入中腸細胞內進行感染，但封埋性病毒在血腔內不會感染細胞。因此在體外增殖之細胞層次的感染，病毒與細胞之吸附能力是病毒感染細胞的第一步，所以 GP64 應是核多角體病毒感染初期之重要關鍵，由 θ /LD 和 c782/LD 之 ECV 對細胞吸附係數上，可見 θ 與 c782 分別對其同源 (PN) 與近緣細胞 (LD) 具有顯著的高數值 (97 以上)，其對於異源細胞上 (θ /LD 與 c782/PN) 則數值較低，尤其 c782/PN 之吸附係數僅有 2.2，顯然 c782 病毒株進入 PN 細胞有其困難性，此因素應可推測是胞外病毒上的端體，亦即 GP64 所致。

從感染效價與吸附係數上，僅能提供病毒感染細胞初期與末期之結果，至於病毒在細胞內活動的情況，則無法窺知。因此藉由抗體

螢光偵測期能觀察病毒在細胞內的活動情形。由於核多角體病毒侵入細胞之機制並非只有上述的兩種狀況，不具被膜的蛋白質鞘與分離的病毒 DNA 皆具有感染細胞之能力 (Bud and Kelly, 1980; Burand et al., 1980; Potter and Miller, 1980)。因此所使用之 ECV 並無法排除其內含有不具被膜的蛋白質鞘和游離的病毒 DNA 之存在，此現象可在螢光偵測上獲得些許線索。圖一證實所使用之抗體 (Ab_{lyxy} 與 Ab_{penu}) 並不會產生非特異性之反應，故可肯定此二抗體具有高度特異性，適合本實驗之應用。從 c782/LD, θ /LD, θ /PN 上雖在螢光反應上略有差異，但其於感染過程上仍呈現一致性之現象，亦即在感染後 24hr 時，正反應只限於胞質內，而後續時段正反應趨弱，至感染後 120hr 時，c782/LD 與 θ /PN 組之受感染細胞呈現整個細胞的強烈且均質狀的正反應訊號，但 θ /LD 僅有部份細胞呈現如此強烈反應。至於 c782/PN 在感染後 24hr 時，雖細胞質中亦有正反應，但在感染後 120hr 時，正反應還只侷限於胞質中並呈不均勻的正反應訊號分布，此外，PN 細胞數目有增加之現象。綜合以上的討論可作如下結論：

1. c782 感染 PN 細胞後乃有病毒能進入細胞內，但不能成功複製子病毒。
2. c782 並不能抑制 PN 細胞之增殖，對 PN 細胞病原性弱。反之， θ 對於 LD 與 PN 皆有抑制細胞增殖之能力，並具有強病原性。
3. θ 僅感染部份 LD 細胞，因此 LD 細胞對 θ 而言僅為半接受細胞 (semipermissive cells)。
4. GP64 並非影響 c782 感染 PN 細胞的主要因素，由圖三 1b 可見，仍有 c782 病毒藉由如蛋白質鞘或游離 DNA 方式進入 PN 細胞內。

1997 年 Heldens 等人之研究結果顯示轉錄之後產生之 SeMNPV 病毒 RNA 主要帶 (major band) 於感染 Se-IZD2109 細胞後 4~8hr 可見，12hr pi. 消失，48hr pi. 方重現訊號。病毒 RNA 偵測結果之差異，可歸因和細胞感染情形、病毒複製、RNA 量、探針強度、雜合反應進行、呈色作用等 (Volkman and Knudson, 1986)。抗體作用之反應是依賴病毒蛋白或大分子的產生而呈強弱螢光反應。感染初期，螢光強弱是依賴侵入的病毒所產生的反應，待病毒被去殼 (uncoated) 後，病毒蛋白被分解而使螢光反應趨弱，之後病毒增值，病毒蛋白質產生、增加而使螢光反應訊號增強 (120hr pi.)，此現象可見於 c782/LD, θ /PN 及 θ /LD 的

感染實驗上。病毒蛋白的增多亦可意味病毒 mRNA 之增加所致，雖然感染時序上有差異，尤其 θ /PN, c782/LD 及 θ /LD 之感染時序較 AcMNPV/SF-21AE, AcMNPV/TN-368 (Volkman and Knudson, 1986) 以及 SeMNPV/SE (Heldens et al., 1997) 遲 12 至 24hr，但其病毒感染週期大致相同。

LyxyNPV 與 PenuNPV 之 *gp64* 的 DNA 相似度只有 35%，胺基酸之相似度更低，只有 9%。由此可見兩病毒間 GP64 之差異極大，再從吸附係數著眼，c782/LD 與 θ /LD 之差有 34.4， θ /PN 與 θ /LD 有 35.2 之差距，兩者情形相近。但 θ /PN 與 c782/PN 則高達 96.4 之多。由以上之結果，可知 θ 與 c782 之端體有很大之不同，侵入 PN 與 LD 細胞的程度才有如此顯著的不同，因此可能的因素有二：

1. PN 細胞之胞膜上缺乏 c782 可結合之受器 (receptor)。
2. PN 細胞本質上較缺乏胞食及胞飲之活性。

Tsai (1997) 曾以螢光顆粒及多角體 (polyhedral inclusion body, PIB) 測試各種昆蟲細胞的胞食能力，證明了 PN 細胞較其他四種測試細胞為最弱的一種細胞，因此，在此也不能排除 PN 細胞本質上較缺乏胞飲之活性之可能性。從 c782/PN 之螢光偵測上得知，c782 不能在 PN 細胞內增殖並非發生在病毒進入細胞內之過程，而是在於病毒之複製上。故端體上之差異可能影響病毒之感染力，而非病毒的複製能力。因此 LyxyNPV 與 PenuNPV *gp64* 核酸與胺基酸序列之差異，並非 c782 不能在 PN 細胞內增殖的重要因素。

Maeda et al. (1933) 利用同源重組 (homologous recombination) 之方法，將 AcMNPV 之 *hel* 殖入 BmNPV 之基因組內，而達到使 BmNPV 可在 SF-9 細胞內增殖，以達到擴大 BmNPV 寄主域之目的。並利用篩選和定序之方法完成家蠶 *hel* 基因之 ORF 共 3666 nt 的定序，並應確定了在 ORF 的 1238 至 1809 nt 之序列具有擴大寄主域之作用。經進一步比較 PenuNPV / LyxyNPV 相對於 BmNPV ORF 內 1238 至 1809 之片段，其相似度僅達 46%。相對地，BmNPV / AcMNPV 則有 95% 之相似度。因此，此片段的相似度並不能完全決定寄主域之差異。Adhrens and Rohrmann (1996) 利用 OpMNPV *hel* 片段與 AcMNPV DNA 亦或 AcMNPV *hel* 片段與 OpMNPV DNA 分別共感染於 LD 細胞或 SF 細胞，發現前者可在 LD 細胞內複製，但其效價卻下降一半；後者卻失

敗，即 OpMNPV 雖有 AcMNPV *hel* 之助或置換也不能在 SF 細胞內複製，相同之情況可見於 AcMNPV 之聚合酶 (polymerase) 基因被 OpMNPV 聚合酶基因取代，仍可維持其在 SF 細胞感染效率，但反之地 OpMNPV 之聚合酶基因被 AcMNPV 聚合酶基因取代，則在 LD 細胞內會造成效率下降之現象 (69%)。相似的研究 Heldens et al. (1997) 以甜菜夜蛾核多角體病毒 (*Spodoptera exigua* MNPV, SeMNPV) 之 *hel* 和 *ie* 基因，與 AcMNPV 相同基因之共感染實驗上，證實了二基因並不能影響 SeMNPV 的寄主域，因此認為寄主域並非單純受到某些基因的影響，須視各種複製因子相互作用之結果而定。

以 RT-PCR 方法偵測 *gp64* 及 *hel* 之表現上，c782/HH 組皆未見 *gp64* 及 *hel* 產物形成，其因素推測應是病毒基因在 NTU-PN-HH 細胞中不能表現之故，然而對 c782/LD 而言，理應有合理表現結果，但其結果卻與推測不符。由於 c782 在細胞內之複製週期較其他核多角體病毒延遲 (Tanada and Kaya, 1993)，因此在感染後 120 小時之偵測下，也許尚未達此二基因表現之時序。然而 *gp64* 屬晚期基因，c782/LD 組在感染後 120 小時內無擴增產物形成，也許是病毒效價不佳所致，抑或有其他干擾因子存在所造成，其真正因素仍有待進一步之釐清。從本論文的研究成果上雖並不能釐清 θ 與 c782 寄主域差異之影響因子，但由 c782/LD 的螢光抗體結果，可知寄主域影響因子確實存在於病毒基因的表現與相互作用上。相關的實驗已於實驗室策劃中。

桿狀病毒科之種類，被分成核多角體病毒 (NPV) 與顆粒體病毒 (GV, granulovirus) (Murphy et al., 1995)，根據多角體基因 (polyhedrin gene) 序列，鱗翅目 NPVs 又被區分成 I 及 II 群 (Group I, Group II) (Zantto et al., 1993)。近年來，根據多角體基因序列共有 27 種 NPVs 及其分離株被整理分群，屬 I 群有 8 NPVs，II 群有 19 NPVs，其中 PenuNPV 及其近緣 OpMNPV 都被歸類於 I 群，LyxyNPV 近緣 LdMNPV 屬 II 群，另外以聚合酶基因 (DNA polymerase gene) 序列，再細分為 II 群為 A, B, C 亞群，其中 II-A 亞群有 6 NPVs，II-B 亞群有 3 NPVs，II-C 亞群有 2 NPVs，但屬 II 群之 LdMNPV 為獨立的一亞群 (Bulach et al., 1999)。此種利用分子標示分析親緣關係的研究，應以 2 個基因以上較為客觀，事實上，由作為研究目標的 *gp64*、*hel* 及 *polh* 基因序列而言，PenuNPV 與 OpMNPV 在 *gp64* 上有 92% 相似度，而於 *hel* 上亦有 97% 相似度，是屬近緣種，其亦符合本研究是先前對於 *polh* 基因

序列之結果 (99%相似度) 之報導 (Chou et al., 1996)。另一方面, LyxyNPV 與 LdNPV 兩病毒在多角體蛋白基因的核苷酸序列 (93%相似度) 和胺基酸序列 (100%相似度) 幾乎完全相同, 而 LyxyNPV *gp64* 及 *hel* 亦分別對於 LdMNPV 皆有 90%以上的相似度。因此在 *gp64* 及 *hel* 核酸序列上亦符合之前利用多角體基因序列所確定之親源關係, 即 PenuNPV 屬 I 群, LyxyNPV 與 LdMNPV 屬 II 群的结果。雖然如此, 有趣的是核酸序列的高相似度, 並不意味轉譯蛋白之相似度, 此現象可見於解螺旋酶胺基酸組成之差異程度上, PenuNPV / OpMNPV 只有相似度 27%, 而 LyxyNPV / LdMNPV 有 71%; 另外, 在 GP64 上, LyxyNPV / LdMNPV 相似度只有 36%, 而 PenuNPV / OpMNPV 有 61%, 至於為何各病毒株之間, 胺基酸序列之保守性低於核酸序列之保守性, 則有待後來進一步之研究。

利用限制酶切割片段分析桿狀病毒 DNA 可區別桿狀病毒的變異種 (variants) (Lee and Miller, 1987; Smith and Summer, 1978b) 及分辨其親源相近的病毒。雖然目前的結果顯示 LyxyNPV 與 LdMNPV 兩病毒在 *hel*、*gp64* 及 *polh* 基因之核酸序列上十分類似, 但是此兩病毒的各種限制酶圖譜都不相同, 以 *EcoRV* 限制酶切割片段為例, LyxyNPV 之 *EcoRV* 限制酶切割片段有 A 到 Q 共 17 個片段; 而 LdMNPV 限制酶切割片段有 A 到 J 共 10 個片段 (Smith et al., 1988), 在其它限制酶片段也有同樣差異很大的情形。再者, 藉由南式轉印法確定 LyxyNPV 之 *polh* 基因位於 *EcoRV*-L (4.3kbp) 片段上, 而 LdMNPV 之 *polh* 基因則位於 *EcoRV*-C (25.6kbp) 片段上 (Smith et al., 1988), 亦可證實 LyxyNPV 與 LdMNPV 應屬於兩不相同的病毒株。另外, 由於 LyxyNPV 多角體基因之核酸序列上有一 *Bam* III 限制酶切位, 而在 LdMNPV 多角體基因之核酸序列上則無, 因此可利用 PCR-RFLP 快速區別此二病毒株。

桿狀病毒被認為是具有生物防治潛力的蟲生病毒, 其寄主域在生物防治應用上有其重要性, 即其能否安全且無污染的使用於環境及其防治害蟲之種類及範圍。因此桿狀病毒寄主域的研究亦受到相當重視, 尤其增效之重組病毒的使用, 須通過風險評估之後才能獲得認可。本論文目前只針對兩種與寄主欲有關的基因做初步的探討, 結果已排除 *gp64* 是影響其寄主域差異之主因, 另一方面, PenuNPV / LyxyNPV 之於 *hel* 核酸序列上之差異有 51%, 但 PenuNPV θ strain 可在 LD 細胞增殖, 而 LyxyNPV c782 strain 卻未能於 PN 細胞株增

殖, 其間關係可能並不單純, 影響之因子並不止於 *hel* 基因之差別外, 其他影響寄主域基因之相互關係亦是須考慮的因子, 甚至於寄主細胞內的影響因素亦不能排除。本論文在寄主域之研究上可說只是起步, 但在 LyxyNPV 及 PenuNPV 之 *gp64* 及 *hel* 基因之選殖、定序上已完成, 另外, 完成的 LyxyNPV 基因庫之建立及抗體之製備, 皆可成為進一步研究之工具。

六、參考文獻

- Ahmad, M., S. M. Srinivasula, L. Wang, G. Litwack, T. Fernandes-Alnemri, and E. S. Alnemri. 1997. Spodoptera frugiperda caspase-1, a novel insect death protease that cleaves the nuclear immunophilin FKBP46, is the target of the baculovirus antiapoptotic protein p35. *J. Biol. Chem.* 272: 1421-1424.
- Ahrens C. H., and G. H. Rohrmann. 1996. The DNA polymerase and helicase genes of a baculovirus of *Orgyia pseudotsugata*. *J. Gen. Virol.* 77: 825-837.
- Birnbaum, M. J., R. J. Clem, and L. K. Miller. 1994. An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *J. Virol.* 68: 2521-2528.
- Bud, H. M., and D. C. Kelly. 1980. Nuclear polyhedrosis virus DNA is infectious. *Microbiologica* 3: 103-108.
- Bulach, D. M., C. A. Kumar, A. Zaia, B. Liang, D. E. Tribe. 1999. Group II nucleopolyhedrovirus subgroups revealed by phylogenetic analysis of polyhedrin and DNA polymerase gene sequences. *J. Invertebr. Pathol.* 73: 59-73.
- Bump, N. J., M. Hackett, M. Hugunin, S. Seshagiri, K. Brady, P. Chen, C. Ferenz, S. Franklin, T. Ghayur, and P. Li. 1995. Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science* 1995 269: 1885-1888.
- Burand, J. P., M. D. Summers, and G. E. Smith. 1980. Transfection with baculovirus DNA. *Virology* 101: 296-290.
- Chao J. T., P. W. Schaefer, Y. B. Fan, and S. S. Lu. 1996. Host plants and infestation of *Casuarina* moth *Lymantria xyliana* (Lepidoptera: Lymantriidae) in Taiwan. *Quart. J. Chinese Forest.* 11: 23-28.
- Chen, C. J., M. E. Quentin, L. A. Brennan, C. Kukel, and S. M. Thiem. 1998. *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus hrf-1 expands the larval host range of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. *J. Virol.* 72: 2526-2531.
- 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.
- 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.
- Croizier, G., L. Croizier, O. Argaud, and D. Poudevigne. 1994. Extension of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus host range by interspecific replacement of a short DNA sequence in the p143 helicase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 48-52.
- Crook, N. E., R. J. Clem, and L. K. Miller. 1993. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J. Virol.* 67: 2168-74.
- Du, X., and S. M. Thiem. 1997. Characterization of host range factor I (hrf-I) expression in *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus- and recombinant *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected IPLB-Ld652Y cells. *Virology* 227: 420-430.
- Granados, R. R., and K. A. Williams. 1986. In vivo infection and replication of baculoviruses. pp98-108. in: R. R. Granados, and B. A. Federici. eds. *The biology of baculoviruses*. Vol. I. CRC press, 275pp.
- Guzo, D., H. Rathburn, K. Guthrie, and E. Dougherty. 1992. Viral and host cellular transcription in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus-infected gypsy moth cell lines. *J. Virol.* 67: 469-475.
- Heldens, J. G. M., Y. Liu, D. Zuidema, R. W. Goldbach, and J. M. Vlask. 1997. Characterization of a putative *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus helicase gene. *J. Gen. Virol.* 78: 3101-3114.
- Huang, C. C. and J. G. Tsay. 1998. Insect pests and their damage to *Casuarina equisetifolia*. *J. Chiayi Ins. Tec.* 62: 157-164. (In Chinese)
- Huang, C. C., L. Y. Chou, and J. G. Tsay. 1998. Notes on Parasitoids of *Lymantria xyli* (Lepidoptera: Lymantriidae) in Taiwan. *J. Chiayi Ins. Tec.* 61: 153-159. (In Chinese)
- Kamita, S. G., and S. Maeda. 1997. Sequencing of the putative DNA helicase-encoding gene of the *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus and fine-mapping of a region involved in host range expansion. *Gene* 190: 173-179.
- 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.
- Kuzio, J., and P. Faulkner. 1993. An overview of the molecular biology and applications of baculoviruses. pp.17-50. in: M. F. A. Goosen, A. J. Daugulis, and P. Faulkner. eds. *Insect cell culture engineering*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Laufs, S., A. Lu, K. Arrell, and E. B. Carstens. 1997. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus p143 gene product is a DNA-binding protein. *Virology* 228: 98-106.
- Liang D. R., Y. N. Cai, D. Y. Liu, and Q. L. Zhang. 1986. *The atlas of insect viruses HuNan*. Science technology publishing House. pp. 196.
- Lu, A., and E. R. Carstens. 1991. Nucleotide sequence of a gene essential for viral DNA replication in the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 181: 336-347.
- Lu, A., and E. R. Carstens. 1992. Transcription analysis of the EcoRI D region of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus identifies an early 4-kilobase RNA encoding the essential p143 gene. *J. Virol.* 66: 655-663.
- 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.
- Matsumura, S. 1933. *Lymantridae of Japan-Empire*. Ins. Matsum. 7: 111-152.
- Mazzone, H. M. 1985. In vivo insecticides for biological control. pp. 695-734. K. Maramorosch, and K. E. Shermans ed. Academic Press, London and New York.
- McClintock, J. T., and E. M. Dougherty. 1987. Superinfection of baculovirus-infected gypsy moth cells with the nuclear polyhedrosis virus of *Autographa californica* and *Lymantria dispar*. *Virus Res.* 7: 351-364.
- McClintock, J. T., E. M. Dougherty, and R. M. Weiner. 1986. Semipermissive replication of a nuclear polyhedrosis virus of *Autographa californica* in a gypsy moth cell line. *J. Virol.* 57: 197-204.
- Monsoma, S. A., A. G. P. Oomens, and G. W. Blissard. 1996. The GP64 envelop fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission of infection. *J. Virol.* 70: 4607-4616.
- Monsoma, S. A., and G. W. Blissard. 1995. Identification of a membrane fusion domain and an oligomerization domain in the baculovirus GP64 envelope fusion protein. *J. Virol.* 69: 2583-2595.

- Mori, H., H. Nakazawa, N. Shirai, N. Shibata, M. Sumida, and F. Matsubara. 1992. Foreign gene expression by a baculovirus vector with an expanded host range. *J. Gen. Virol.* 73: 1877-1880.
- Murphy, F. A., M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis G. P. Matelli, M. A. Mayo, and M. D. Summers. 1995. Classification and nomenclature of viruses. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol. Suppl.* Springer-Verlag, Wien. New York. 586pp.
- Nealis, V. G., and S. Erb. 1993. A sourcebook for management of the gypsy moth. Ministry of Nature Resources, Forestry Canada. 47pp.
- Oomens, G. W., and G. W. Blissard. 1999. Requirement for GP64 to drive efficient budding of *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *Virology* 254 : 297-314.
- O'Reilly, D. R., L. K. Miller, and V. A. Luckow. 1992. Baculovirus expression vector. W. H. Freeman and company. New York. 347pp.
- Passarelli, A. L., and L. K. Miller. 1993. Identification of genes encoding late expression factors located between 56.0 and 65.4 map units of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. *Virology* 197: 704-714.
- Potter, K. N., and Miller, L. K. 1980. Transfection of two invertebrate cell lines with DNA of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.* 36: 431-432.
- Murphy, F. A., M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis G. P. Matelli, M. A. Mayo, and M. D. Summers. 1995. Classification and nomenclature of viruses. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol. Suppl.* Springer-Verlag, Wien. New York. 586pp.
- Tanada, Y., and H. K. Kaya. 1993. DNA-Viral Infection : Baculoviridae. pp171-244. in *Insect Pathology*. Academic press. San Diego. 633pp.
- 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.
- Tsai, P. F. 1997. The role of AcMNPV occlusion body in intercellular transmission in IPLB-SF-21AE. Master's Thesis of Graduate Institute of Plant Pathology and Entomology in National Taiwan University. 51pp. (In Chinese)
- Volkman, L. E., and Knudson, D. L. 1986. In vitro replication of baculoviruses. in : *The Biology of Baculoviruses*, Vol.1. Granados, R. R., and Federici, B. A. Eds. CRC Press, Boca Raton, FL. pp.109
- Volkman, L. E., and P. A. Goldsmith. 1985. Mechanism of neutralization of budded *Autographa californica* NPV by a monoclonal antibody: inhibition of entry by adsorptive endocytosis. *Virology* 143: 185-195.
- Volkman, L. E., P. A. Goldsmith, R. T. Hess, and P. Faulkner. 1984. Neutralization of budded *Autographa californica* NPV by a monoclonal antibody: Identification of the target antigen. *Virology* 133: 354-362.
- Wang, C. H., and S. J. Tsai. 1995. Life history of the *Perina nuda* (Fabricius) and virus production of the infected pupae. *Chinese J. Entomol.* 15: 59-68. (In Chinese)
- Whitford, M., S. Stewart, J. Kuzio, and P. 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.
- 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. 2nd ed. China forestry publishing house. pp. 1362. (In Chinese)
- Yu, C. C., H. H. Kao, C. H. Wang, J. T. Chao, and S. S. Lu. 1998. Characterization of *Lymantria xylin* Nucleopolyhedrovirus (Lyxy NPV) and the Establishment of in vitro Multiplication of LyxyNPV. *Chinese J. Entomol.* 17 : 11-22. (In Chinese)
- Zanotto, P. M., B. M. Kessing, and J. E. Maruniak. 1993. Phylogenetic interrelationships among baculoviruses: evolutionary rates and host associations. *J. Invertebr. Pathol.* 62: 147-164.