

應用昆蟲致病性病毒為殺蟲劑之潛力*

T. W. Tinsley 著

蕭文鳳 譯**

一、緒 言

昆蟲是人類糧食強而有力的競爭者，如何保持害蟲在經濟和生態為害界限範圍內，實乃刻不容緩之事。世界人口不斷增加，且有許多地區一直處於營養不良狀態，加上經常性的饑荒，不僅吾人應當生產更多的糧食，且需減少收成前後的蟲害損失，⁽⁶⁵⁾。在發現昆蟲可產生抗藥性前，化學殺蟲劑一直是提供了合理而有效的防治方法。對付昆蟲抗藥性短期的治標方法是增加劑量，此法常會使防治工作陷於危險，一旦藥劑失效時，只得採用其他新的配方或新產品。結果導致藥劑成本的提高，施藥量及次數增加，更嚴重的，是造成生物界的污染。特別是水的污染，造成魚類和其他野生生物對殘留農藥的累積。這些問題引起大眾的憂慮，進而對農業人員、政府當局及農藥工業界猛烈抨擊。於是，更安全且不造成污染的害蟲防治方法乃為眾所需求，這些方法強調自然系統，一般稱為「生物」「生態」或「有機」的防治法。近年來因石油原油價格的急劇上漲，而直接影響許多殺蟲劑配方成本，再加上世界性通貨膨脹，使人工及設備費日增而提高生產成本。許多熱帶開發中國家，農民只能勉強維持生活，財務僅可維持平衡，在此種情況下，如無政府的補助或外援，欲改進農業生產技術使用有效的化學防治方法以防治害蟲是不可能的。

因此，採用生物和綜合防治系統是很合理的，此舉能減少生態上的危險，且防治成本比傳統的化學防治花費少。本文特將昆蟲病毒病原的利用作一總論討。以微生物和病毒來防治重要害蟲的觀念，始於對家蠶疾病的研究。Bassi⁽⁶⁾ 曾是此研究先鋒，隨後 Le Conte⁽⁷⁷⁾、Pasteur⁽⁹²⁾ 和 Hagen⁽⁴⁾ 繼續完成，漸發展成具體的概念，此觀念導引 Metchnikoff⁽⁹⁹⁾ 在蘇俄南部以綠僵菌 *Metarrhizium anisopliae* 做甜菜害蟲田間防治試驗。此生物防治觀點之形成上有二重要階段——即逐漸認知此病毒具傳染毒性，且疫病所造成的死亡數可有效抑制害蟲棲羣密度。

致病性昆蟲病毒常在昆蟲棲羣中造成自然疫病，此點文獻已有詳盡的報導。典型的例子，如 Glaser & Chapman⁽⁴⁰⁾ 記載舞蛾，*Lymantria dispar* 會因核多角體病毒引起顯著的死亡。Koyanma & Katagiri⁽⁷⁶⁾ 報導，相近種 *L. fumida* 有相似的疫病流行，造成寄主棲羣顯著地下降。苜蓿蛾 *Colias philodice eurytheme* 由核多角體病毒引起的萎凋病，常在加州的 San Joaquin 山谷造成廣布的疫病，尤以八月和九月發生最多^(1,11)。

* 本文譯自 "The potential of insect pathogenic viruses as pesticidal agents" Ann Rev. Ent. 1979, 24:63-87.

** 臺灣植物保護中心昆蟲組研究助理

惜苜蓿蛾的病毒疫病無法定期發生，故不能依賴其大發生而達成滿意的經濟防治，且作物常在已受到嚴重損害後，疫病才蔓延，為時已太晚，喪失經濟價值。Thompson & Steinhaus⁽¹¹⁵⁾ 認為，疫病的起始和發展受到複雜因子所影響。其中最基本的因子是寄主的密度和氣候狀況；因此，對自然疫病做較深入的了解，是有助於發展較佳病毒以防治經濟害蟲。

大部份生物防治的早期工作中選用的病毒是從致病昆蟲的棲羣中分離出。在許多例子中能引用的四個之一即是 Smirnoff 等人⁽⁹⁸⁾ 自松葉蜂 *Neodiprion sawainei* 的幼蟲屍體分離出多角體病毒，再溶於 oil-bentonite 製成懸浮液可有效達成防治效果。同樣的，自維吉尼亞松葉蜂 *N. pratti pratti* 分離之多角體病毒，空中施放後，在16天內可造成松葉蜂 100% 死亡率。

無意中，由歐洲將歐洲樅樹葉蜂，*Gilpinia hercyniae* 及歐洲松葉蜂 *Neodiprion sertifer* 引入美國後，這二種蜂很快的在北美洲散佈。幸運的是，在引進寄生天敵防治此害蟲時也帶進一種核多角體病毒，此病毒快速的傳播而引發大規模的疫病。歐洲松葉蜂在1900年代早期引進北美的，隨後的棲羣發展過程中一直未受病毒的感染，反觀在歐洲此病毒一直肆虐着歐洲松葉蜂^(31,38) 病蟲自瑞典送到

加拿大安大略(Ontario)後，再由此病蟲分離出之核多角體病毒施於田間時，證實非常有效^(11,12,13)。大部分能在田間引起疫病而能有效防治之昆蟲病毒，皆屬於桿形病毒羣之核多角體和顆粒體病毒。這類病毒很容易跟其他病毒區別，因為此類病毒顆粒是包在蛋白質包涵體內，其個體在普通光學顯微鏡觀察中可見到。唯此類桿形病毒只不過是昆蟲病毒病原之一羣。若以昆蟲綱中無數之昆蟲種類，則昆蟲必涵蓋為數甚廣之病毒羣。目前已知的致病性昆蟲病毒由表1可知大致可分為七羣。不過若再仔細區分鑑定，則數目尚不止於此。昆蟲病毒之分類尚在萌芽階段，其命名一般是沿用脊椎動物病毒已確定名稱者。雖有些昆蟲病毒的物理和化學特性與

脊椎動物病毒相似，但有些則不同，且有些則限於無脊椎動物寄生範圍。所以，現今以生化學上的特性的相似點來分類昆蟲病毒是不妥當的。Tinsley⁽¹¹⁸⁾主張昆蟲病毒的分類應以病毒間的交互傳遞(cross-transmissibility)之潛能及其寄主專一性做為分類研究基礎。

已知桿形病毒能有效的控制昆蟲棲羣，其寄主範圍只限於無脊椎動物，特別是對昆蟲綱之寄主專一性更是明顯，因此類病毒容易大量生產，且在某些特定的情況下，相當穩定，用於自然環境中亦不可能引起生態危險，故被挑選為最具潛力的殺蟲因子^(111,117,120,123)，因桿形病毒大又具獨特構造，故此病毒對脊椎動物具專一性的假設是合理的。

表1. 昆蟲體內所發現之致病病毒

科名	核酸形態	顆粒對稱性	生物化學或生物物理上的相似性	
			脊椎動物病毒	植物病毒
桿形病毒科 (桿形病毒 A. B. C)	去氧核糖核酸	桿形 (包涵體)	無	無
痘疹病毒科 (蟲生痘疹病毒)	去氧核糖核酸	磚形 (包涵體)	Orthopoxvirus Avipoxvirus Capripoxvirus Leporipoxvirus Parapoxvirus	無
里奧病毒科 (質多角體病毒)	ds 核糖核酸	等晶軸的 (包涵體)	Reovirus Orbivirus	植物里奧病毒
虹彩病毒科 (虹彩病毒)	去氧核糖核酸	等晶軸的	African Swine Fever Frog Virus 1-3 Lymphocystis virus	真菌，藻類
巴伐爾病毒科	ss去氧核糖核酸	等晶軸的	Parvovirus Adeno-associated group	無
匹孔拿病毒科 (昆蟲病毒，未確定者)	核糖核酸	等晶軸的	Enterovirus	小型核糖核酸病毒 (單股為多性鏈)
桿狀病毒科	核糖核酸	砲彈形	Vesiculovirus Lyssavirus	植物桿狀病毒科

二、桿形病毒

(一)性質與特性

桿形病毒原大部分由鱗翅目、膜翅目和雙翅目昆蟲分離出，不過最近也有報導自蚊子 *Aedes triseriatus* 和 *Wyeomyia smithii*⁽⁴³⁾。毛翅目，*Neophylax sp.*⁽⁴¹⁾ 和蝦 *Penaeus duorarum* 中^(18,19)。發現桿形病毒，此即指病毒的寄主範圍要比我們原先所得知的來得寬廣。病毒的感染多在幼蟲期。是由攝入含有病毒的食物所引起，病毒的潛伏期是隨幼蟲齡期、溫度、營養、棲羣密度及其他

病原的發生而有所變化，感染早期的病徵並不顯著，但後期可能因神經營養和代謝的不正常有發生行為的改變。幼蟲行動減緩且體壁顏色變淡。至感染後期體壁極易破裂，且大量的病毒包涵體(多角體或顆粒體病毒)，會隨着體液的流出而釋出體外。以此法釋出之病毒，將會污染食料，且能經由風和雨水帶到其他植株上。

包涵體的特徵會隨形狀而有不同，一般直徑為 0.5~1.5 μ m，故能在光學顯微鏡下找到。核多角體的包涵體由許多病毒顆粒組成，顆粒體病毒只含一個病毒顆粒，這些包涵體被一層立方格子結構的側

晶體母質的蛋白質所圍繞^(9,10)，雖然病毒顆粒是隨機分布，被膜包圍的，顯然的並不會影響晶體蛋白母質的性質，分析此蛋白母質的化學成分，顯示除蛋白質外另外含核糖核酸 (RNA)，脂肪和許多微量元素^(96,122)，故有人認為，矽在其立方格子結構中具有重要之功能^(33,35)。已知包涵體含有核糖核酸，但其來源、性質和功能仍不清楚^(1,34)。

做超薄切片電子顯微鏡觀察時，成熟的包涵體呈現出一周邊電子密集層。以 0.1M 碳酸鈉溶解它，內容物會釋出。若經不同程度的離心，能使多角體分開，此結構被稱為多角體膜 (polyhedron membrane)，雖然它們的存在曾為爭論的題目⁽⁹²⁾，不過，Harap⁽⁴⁸⁾以負染色法處理，能清楚的見到這些棋盤狀的構造，因而證實這些「膜」是存在的。在多角體或夾膜包涵體內的病毒顆粒體是桿狀，是單一或成羣的。含膜的病毒顆粒體，其寬約 40-140 nm，長約 300-330 nm 之間，視所含之病毒顆粒的數目而定。若為只包含一個病毒顆粒體者，其大小為 60-70×260-300 nm⁽⁴⁹⁾。

包涵體能有效地保存病毒顆粒的感染力，純化的包涵體能以乾燥的粉末或是液體懸浮液狀態保存在相當寬廣的溫度範圍內。包涵體能抗細菌感染。對廣泛的化學物質處理有抗性⁽¹³⁾。但對高 pH 值溶液如 0.1M 碳酸鈉溶液相當敏感。包涵體之側晶體蛋白質在此情況易被溶解，溶解後病毒顆粒若經離心作用可收回。包涵體蛋白能因調節鹼溶液至 pH 5.8 的當量點而形成沉澱。

核多角體病毒和顆粒體病毒含去氧核糖核酸，若以甲基甘膠酸 (sacrosine) 處理病毒，再置於含有 ethidium bromide 染料氯化鎳密度層次層中離心，則可找到含閉環狀的 (supercoiled)，開環狀的 (nicked) 和線狀的去氧核糖核酸^(107,109)。

在氯化鎳溶液中利用比重密度原理計算，鳥嘌呤 (guanine) 和胞嘧啶 (cytosine) 含量會因所分離病毒種類不同而介於 41-47%。顆粒體病毒以中性的蔗糖層次測試，知其分子量 100×10^6 ；核多角體的去氧核糖核酸則稍微小些。Bellett⁽⁸⁾ 曾比較核多角體病毒和顆粒體病毒的去氧核糖核酸，發現可用病毒的去氧核糖核酸中氨基酸成分不同為分類依據，此由血清的交叉反應及病毒蛋白質的氨基酸成分的數值可支持。

(二) 入侵機構和途徑

雖然已有資料提到桿形病毒早期感染階段及感染途徑，但病毒如何侵入昆蟲及引起疾病，至今仍

不完全明瞭。病毒可經由口腔、卵、傷口或互相殘殺而侵入蟲體。在自然情況下，經口感染是最常見的，雖有許多報告提到病毒可經卵傳播，但 Longworth⁽⁷⁷⁾ 認為並無足夠明顯的證據支持此現象。因卵的表面常附有胎糞或糞便而造成卵孵化後幼蟲感染之故。相反的，Hamm 和 Young⁽⁴⁵⁾ 證明卵表面有病毒污染而造成的經卵傳佈病毒，並提出很好的例子加以說明。

在試驗的情況下，已知寄生天敵能將病毒自幼蟲傳至另一幼蟲⁽²⁰⁾。大部分情況是由產卵管沾染病毒而傳佈。惟自然界中由幼蟲傳佈病毒的頻度或是其在流行病學上的顯著性仍不明瞭。

包涵體內的病毒顆粒如何經昆蟲口腔進入蟲體組織，一般認為是病毒在中腸發生附着與細胞侵入作用，如 *Aglaia urticae* 的核多角體病毒，最先的感染位置是中腸柱狀細胞，但其複製周期和在其他組織內複製周期不同^(46,47,51)，此情形也見於其他核多角體病毒和顆粒體病毒上^(75,105,106,110)，桿形病毒對鱗翅目感染的可能途徑已由實驗結果證實。

包涵體必須經中腸腔內溶解後才能釋出致病性的病毒顆粒而引發感染，溶解機制主要由具高鹼性 (pH 9.5~10.0) 之腸液所控制。惟除腸液外可能還需某些酵素幫助分解包涵體。病毒顆粒體能自套膜中釋出，與腸微絨毛的柱狀細胞有密切關係，病毒套膜顯然是和微絨毛的原生質膜產生融合再讓核膜進入。

寄主早期感染時，可在微絨毛內壁找到核殼 (nucleocapsid)。其對腸細胞組織的病變影響並不比對其他組織來得嚴重，光學顯微鏡下觀察，受感染之腸細胞並無顯著的變化。主要原因是受感染細胞區相當局部化，故不易發現，被感染的柱狀細胞其核內都能找到裸露或含有封套的病毒顆粒。並有一小且分離的團塊，顯然是聚合化的包涵體蛋白，其表露之特殊的結晶格子外表與包涵體切片有關。在感染細胞核內發現有囊狀構造電子密集球狀體和顆粒體核原生質，但並無明確的網狀病毒原生質存在。在幼蟲腸柱狀細胞或其他幼蟲組織，病毒的複製顯著不同的，即是病毒顆粒並不包含在聚合的核多角體蛋白質內，且不形成典型的包涵體。

吾人亦可在柱狀細胞的細胞質內找到病毒顆粒，但多在細胞核和基底層 (basal lamina) 之間。此細胞的部位很迂曲的，故頗難判定含套膜的病毒顆粒是在細胞膜內或膜外。至今仍難明瞭的是

病毒顆粒是如何離開細胞的，但能在基底層內和鄰接於氣管的皮膜細胞之間發現它。很明顯的，是在柱狀細胞外。不過，顆粒體病毒感染時，病毒顆粒離開柱狀細胞，並產生一套膜⁽⁶⁵⁾。病毒在正常情況下是在氣管組織內複製的。且含病毒顆粒之包涵體亦是在此產生。

桿形病毒的感染路徑，對病毒整個感染過程是相當基本且重要的，因此可能與病毒專一性感染有關，且與昆蟲對病毒產生抗性機構有些影響⁽¹¹⁶⁾。

(三) 寄主專一性

測定田間施用桿形病毒是否會引起生態潛在的危險，寄主專一性是一個重要的因子。可惜，有關此問題仍有許多疑點未能解答。昆蟲棲羣裏常會有不明顯的或病徵不顯的病毒感染情形發生。這種感染性質及活化的機構已有人討論⁽⁶⁵⁾。因呈現這種不明顯的病徵，可能大大的影響到利用其他寄生病毒的交互感染的測試，而使結果無效。在此類實驗，吾人無法確定是因病毒所引起抑或自然界已存在但病徵不明顯的感染，被刺激或活化而引起者。當測試昆蟲曝露在一種感性或不感性的病毒下常可能會發生因後述原因而引發致病⁽⁷⁹⁾，故應用可資信賴的鑑定方法，如類型專一性抗血清方法 (type-specific antisera) 是相當重要的⁽⁶⁰⁾。Ignoffo⁽⁶⁰⁾曾就此評論，並提出一調查寄主範圍的方法。他正確的強調：吾人最主要的考慮是在病毒傳染至其他寄主前或後能很明確的加以鑑定。不幸，此方面的大部分報告所提供的數據均無法達到此要求，故桿形病毒的寄主範圍或專一性仍未清楚。不過，一般的說明仍可採信。在鱗翅目發現的桿形病毒，並不會與膜翅目幼蟲產生交互感染，反之亦然。桿形病毒的顆粒體病毒亞羣，與核多角體病毒比較呈現較多的屬和種的專一性⁽⁶⁶⁾。

三、桿形病毒的應用

施放病毒在昆蟲的棲羣的目的，即是在自然界中造成一人為的疫病，以降低昆蟲的數目，減少經濟損失。這些疫病若能年復一年地發生，則可增加病毒防治系統的有效性。可惜，自然界中往往是昆蟲已造成相當嚴重的作物損害時，才會發生疫病。極可能是需要在高密度的寄生昆蟲情況下，病毒才會自然傳播。桿形病毒的感染是否能持久的成為有效的防治因子，全視在葉面、土中、昆蟲屍體或罹病越冬的蛹體上的保持力。以下將討論控制穩定性的因子。不過，由田間的實驗報告或文獻中指出，

每年定期的製造人為的疫病可得到滿意的持續力。故在田間應用病毒則不再是自我保持 (self-sustaining) 的系統。顯然的，病毒產品的可利用性和化學殺蟲劑商品是相同的。

鱗翅目和膜翅目幼蟲是取食葉片，顯然地為病毒防治系統的最佳候選。此類昆蟲已有學者列表整理^(100,123)，若在作物專業區，核多角體病毒可由地面或空中噴灑，將病毒施於葉面，進一步利用靈巧的和專門的噴藥設備，多角體病毒能夠落在葉下表面，故能延長感染力，遏止太陽輻射的破壞。

最困難的防治是，如蘋果舞蛾，*Laspeyresia pomonella* 和二化螟 *Chilo suppressalis*，初齡幼蟲蛀食入寄主，葉部、莖部、花和果實的害蟲，則很難為病毒所感染。若需以病毒防治這類具躲藏習性的昆蟲。應在幼蟲剛從卵孵化，未蛀入植物組織前，即施用或藉卵 (transovarial) 傳遞到下代，本文前面曾提及。雖然經卵傳遞仍有許多疑問。眾所皆知，卵的外殼被污染是初孵化幼蟲獲得病毒的來源，曾有學者試圖以沾染昆蟲的卵，測病毒的效果，已經成功^(12,27,84)。雖然 Longworth & Kalmakoff⁽⁸⁰⁾已經注意到需以生態方法來操縱昆蟲疫病之發生。但仍未探究不同的病毒釋放的方法。Ignoffo⁽⁶²⁾已對如何增加有效性作一評論。

防治醫用昆蟲如吸血的雙翅目和倉儲害蟲則不同，在蚊子體內已發現有桿形病毒^(36,43)，也自催催蠅 (Tsetse fly) 和麗蠅 (Blow flies)，虻 (Tabanids)、糠蚊科 (Ceratopogonids)、蚊科 (Mosquitoes) 和許多種蚊子體內發現非桿形病毒的類病毒顆粒體物質。此類昆蟲防治困難之處，即在如何將病毒接入幼蟲和成蟲。有一特例足以說明此問題的重要性，即在美國路易斯安那州 (Louisiana) 數千畝的鹽水和淡水湖內蚊子幼蟲的防治，我們將足夠的病毒接種原施於如此一大片水中是否能達到其效果，頗令人懷疑。納幼蟲是生活在一急流的溪流，在防治納 *Simulium spp* 也發生類似的困擾，病毒一施入水中馬上被稀釋，在流動水的環境，疫病發生學的步驟吾人所知並不多，無疑的，病毒仍能在此一環境中保持感染力和傳播能力。有記載的是小蝦⁽¹⁹⁾和螃蟹^(73,74)，一些學者也考慮以真菌、原生動物和寄生性線蟲來防治會攜病者的媒介昆蟲成蟲。

利用致病性病毒來防治倉庫害蟲，也會碰到難

題。因為幼蟲期可能存在於堅果或乾果的組織內而不易產生防治效果。更複雜的是人畜，食入已用昆蟲病毒處理的食品，和化學藥劑污染食品一樣會產生殘毒問題，故最好能就生態觀點來探討此一問題^(66,69,80)。印度粉斑蛾 *Plodia interpunctella* 為全世界麵粉和堅果最主要的倉儲害蟲，能罹患一種顆粒體病毒病⁽⁴⁾，該病毒病原已經分離，並用在杏仁、花生和胡桃害蟲防治。以每百克堅果施用 8×10^7 顆粒/每毫升水濃度，則剛孵化的幼蟲死亡率達98%⁽⁶⁷⁾。此實驗的良好結果，足以予人深刻的印象，將來可推廣至熱帶區。

四、桿形病毒的發展和利用

(一) 病毒的分離及其表現之特徵

只有純化或經特化的桿形病毒才能在田間使用，此點事關緊要。許多研究者也強調此特性^(111,117,118,121,122)。此因昆蟲會同時被多種病毒侵入，但其中可能只有一種是具有致病力的桿形病毒，故得小心鑑定才行。其他會同時存在的病毒是質多角體病毒 (cytoplasmic polyhedrosis)，匹孔拿病毒 (picornavirus)，或是巴伐爾病毒羣 (parvovirus)，此為脊椎動物體內發現最平常之病毒，生化及生物物理特性上有類似性。為求診斷和鑑定起見，桿形病毒的純化和特性記述已有詳盡的報告⁽⁶⁹⁾。並發展出一研究病毒形態，多角體和病毒顆粒的特性和病毒去氧核糖核酸。以血清系統鑑定核殼非常有趣，並能顯示出一個特殊型的抗原。此結果與前面的假設不同，此被認為是由血清測試病毒顆粒衣膜可表出病毒的內在專一性 (intrinsic specificity)，可能這些構造會決定病毒顆粒如何附着，如何進入腸的細胞^(47,75,106)。若在這種特別的血清，能夠產生用於其他桿形病毒，此一奇妙的方法不僅方便、簡單，且可信賴的診斷方法。

要評估特殊的桿形病毒致病性，專一性及寄主範圍時需一簡單明瞭的鑑定方法。前文已提過，此種調查會受到其他不明顯的或是亞臨床的 (subclinical) 感染的桿形病毒 (有些文獻稱之後期感染) 阻礙。此種感染的真正特性及引發因子或選汰壓力仍未完全確定。Tinsley⁽¹¹⁶⁾ 認為「腸阻礙」(gut barriers) 現象可能與此不明顯的感染有關。他的假說是桿形病毒是否能在昆蟲腸組織存在或受到限制不能發生作用，此與昆蟲體內的防衛機構有關。顯然的，一旦病毒顆粒穿過氣管組織，進

入血體腔 (hemocoel) 就能迅速地引發全身的感染，而使寄主死亡。過去，只有利用物理或化學刺激引發寄主引起感染，方能測出不明顯或後期感染⁽⁶⁾，較敏感的病毒測定方法如螢光抗體，放射線免疫分析及酶聯免疫吸收檢定法 (enzyme-linked immunoabsorbent assay)，可用於闡明在腸組織低水平感染的呈現。任何所測試的事例中，若其中之一為會引起感染的病毒，或為無關的病毒似以不明顯形式存在，被活化而成系統性的感染，研究致病性或是專一性，有足够的專一型血清是很重要的。一般最簡便且最為科學上重視的方法，即是採用無病毒感染的昆蟲測試。不過，此類供試蟲源至今仍不能簡易求得，且只能在吾人對不明顯或後期感染的特性及發生有一完全了解及發展出能消滅供試蟲源內致病病毒的方法後，方能大量生產此蟲源。

田間的防治系統，可能會因不相關的病毒存在，而使不明顯感染活化，產生干擾，將大量的病毒接種源接於一大片區域，除了對象昆蟲以外，也會使其他昆蟲的後期感染活化，若此現象發生在食葉性害蟲，則可增加感染的機會而被認為是獲得紅利了。若是非害蟲也被感染則會引起生態上的困擾，故對昆蟲的不明顯感染及對主宰活化使成致死感染機構的基本研究是急需的。

(二) 環境中感染作用的穩定性和持續力

在田間維持病毒顆粒穩定性最重要因子是包涵蛋白質之包涵體。包涵體對溶劑的作用和具溶解蛋白質酶有相當抗性，故在實驗室內，以 0.1M 碳酸鈉處理，才能將病毒顆粒釋出。Jaques⁽⁷²⁾ 詳加研究病毒病原的穩定性並下結論：桿形病毒在中溫及低溫下相當穩定也不會受濕度的影響，但若暴露在陽光照射下，很快會失去感染力，且在高溫下會逐漸降低感染力。

Steinhaus⁽¹⁰³⁾ 提出，家蠶 *Bombyx mori* 病毒置於 4°C 下，21 年後仍保有感染力。Jaques⁽⁶⁹⁾ 也提出，甘藍莖尺蠖 *Trichoplusia ni* 的核多角體病毒在土中停留四年以上仍具有活性。不過，樅樹葉蜂 *Gilpinia hercyniae* 的核多角體病毒，若暴露在不同的環境下，很快的會失去致病力。故在田間施用時，包涵體的保護特性是很重要的。一個包涵體可含高達 100 個病毒顆粒且能維持一定數量。Joques⁽⁷²⁾ 發現太陽光尤其是光譜中紫外線部分是桿形病毒在田間失去感染力最主要致因。已有許多

學者研究因陽光而失去活性的情形^(15, 26, 63, 68, 81)。許多強而有力的證據顯示，紫外線帶的光譜確實為一致命因子^(16, 21, 41, 63)。紫外線的光譜是介於 250-280 nm。Smirnof⁽⁹⁷⁾進一步證明，紫外線的強度及波長會影響桿形病毒的不活化速度。此發現導致他建議應在太陽下山或傍晚時分施用病毒。以便在病毒因曝曬陽光而降低感染力前，能有較長的時間與對象昆蟲接觸。再者，施於寄主植物葉下表面也能減少因陽光照射而產生的不活化作用。

因陽光對病毒感染力會有不利的影響，故導致吾人尋求一些物質加於施用劑型中，而為防禦紫外線破壞的保護劑。有人取用染料和蛋白質混合，如釀造用酵母加碳，脫脂奶粉加碳，蛋清加碳，能使感染力保持一段較長的時間^(67, 68)，加碳於玉米穗蟲 *Heliothis zea* 核多角體病毒，病毒接種源，其延效作用就如病毒在碳中的高分子包裹作用 (microencapsulation) 一樣有效⁽⁶³⁾。

顯然地，昆蟲體液在阻止陽光雷射產生對病毒不利效果也相當有效。報告中指出，較不純化的製品如含寄主物質者比純化的製品較能抗陽光的不活化作用^(21, 22, 23, 63, 67, 68)。

高溫對桿形病毒的影響比吾人所期望的少，研究報告顯示，空氣溫度 43°C 或土壤溫度 50°C 都不會使感染力有少許的損失^(25, 29, 41, 57, 104, 112)。此溫度正可反應出大部分作物的最高生長界限，故由這些引起的病毒不活化作用未必是明顯的。

病毒與葉片的相關性，可能與田間病毒的穩定性有極大的關係。證據顯示，自葉片分泌的化學物質或是因葉表面濃縮的水所形成的物質會影響病毒感染力。Andrewes & Sikorowski⁽⁹⁾。發現玉米穗蟲 *H. zea* 和另一種穗蟲 *H. virescens* 核多角體在晚間留在王蜀黍葉上會產生不活化現象。調查顯示，晚間葉面上形成的露水，變成高鹼性 (約 pH 8.2-9.1)。若以水沖洗葉片，沖下的水其 pH 值會高至 9.7-10.1。進而以這種鹼性露水，處理多角體，會產生類似弱鹼處理，產生腫脹的情形。可能延長病毒暴露在此種露水的 pH 下，導致破裂而釋出病毒顆粒，故很快地不活化。惜至今仍不明瞭此不活化型發生是否普遍，此結果與前人研究柑桔紅蜘蛛病毒在葉片表面鹼性狀況下會不活化相符合⁽¹⁷⁾，由已知觀察中得知，王蜀黍葉片表面的化學物質會影響玉米穗蟲核多角體病毒的穩定性⁽³³⁾。

病毒在土中的穩定性為桿形病毒生態學上的一

重要因子，因保存之病毒將來可引發自然疫病，一般認為，某些病毒是以具感染力的狀態，在土壤存留一段很長的時間^(24, 56, 65, 69, 71)。顯然地包涵體吸附在土壤顆粒上，就不易被水沖刷掉^(54, 55)，因此，病毒即留在土壤上層幾公分處^(24, 66)。理論上，土壤的 pH 值對包涵體影響很大，如高鹼性或酸性土壤，被認為是會引致病毒分解。Thomas *et. al*⁽¹¹⁴⁾ 發現甘藍擬尺蠖之核多角體病毒於酸性土壤中與近於中性的土壤中較易失去活性。此為最佳的證據，桿形病毒能隨緩慢的釋出或是疫病發生的結果而積聚且長存於土壤內。Tanada & Omi⁽¹¹³⁾ 研究取自加州的土壤樣本中，其結論：因前次自然疫病的結果會導致病毒的分離。甘藍擬尺蠖核多角體病毒和紋白蝶顆粒體病毒施於土壤或甘藍菜葉片上都會在土壤聚積^(69, 70)，故在未處理的試驗區內，一年後病毒的存在水平則與處理組同。此種病毒污染情形的急劇上升，係由自然疫病發生所造成。此實驗闡明，不管是用噴灑處理或自然大發生，病毒在土中的殘存，都能引發下一個昆蟲世代疫病，也能保存長期影響的機構。

五、病毒接種原的生產及釋放

雖然有更多對病毒顆粒有感病性的細胞株 (cell line) 能隨意供應，但是所有的桿形病毒商品仍是以昆蟲幼蟲為材料生產的。以人工飼料餵飼昆蟲，將能使病毒的大量生產的步驟簡化。另法，即當田間疫病發生時採回病蟲。不過，如前面所論述的，這些物質必須小心處理，尤以分離和純化物質更需詳加鑑定，以葉片餵飼昆蟲生產病毒，也會遭遇困難，即葉片很容易帶有其他病毒，故繼續生產病毒的機會會減少。

若以人工飼料餵飼昆蟲罹病是相當簡單的步驟：即直接將純化的病毒噴在人工飼料上，罹病個體未死前採收即可，次將昆蟲屍體加水磨碎，倒入蔗糖分層液中，再置於 A 型極帶旋轉儀器中，將核多角體包涵體純化，所得之多角體可加水放在 -20°C 貯藏或冷凍乾燥成穩定狀態的粉末，在 5°C 下保存。

利用細胞株來生產病毒比用生體系統生產有利，外來病毒污染的機會也可減至最小，整個生長過程可一直保持標準化。不過，若要大規模生產需注意：(a) 每個細胞最高病毒產量能維持一致。(b) 能供應簡化價廉的培養基和 (c) 避免或消除對溫度敏感和其他致病力較低的變種。現在有許多實

驗室都致力於此項研究，若能克服上述困難，則將來大部分的昆蟲桿形病毒將會朝這方向去做。

桿形病毒通常以水懸浮液形式施用，常加用添加劑如可濕性劑、展着劑，附着劑和紫外線保護劑。以油性乳劑或粉劑形式使用並不多。此類製品可於空中噴用，通常都用機翼固定的飛機，偶而用直昇機噴灑。在地面上，病毒製品常用動力噴霧器或是背囊式噴霧器施用。Maksymiuk⁽⁸⁷⁾曾說不同的使用方法包括安全問題加以探討。

美國，有人試圖在田間以含病毒之食餌方式施用^(2,88,90)。在中國，昆蟲病理學家常利用玉米穗蟲 *H. armigera* 核多角體病毒的食餌，並提出用此法較噴用病毒效果好⁽⁵⁹⁾。無疑的，以食餌式應用病毒來吸引昆蟲，所遭遇的生態困擾，較空中噴用少。我們可再回溯參閱 Ignoffo⁽⁶²⁾。所建議研究非傳統法施用病毒。其中包括施用病蟲，取用污染病毒的寄生天敵和捕食天敵，操縱自然疫病之發生，或是引入外來種病原以防治本地種寄主。在田間病蟲能傳播成功例子，即犀角金龜 *Oryctes rhinoceros*^(7,83,124,125) 其成蟲能由取食，鋸木屑和搗碎的病毒罹病幼蟲的混合物或是其他罹病成蟲糞在同一籠內而受感染。甲蟲棲羣內，病毒多在交尾而獲傳佈，可能是感染的成蟲排泄出含病毒物質污染健蟲。當健蟲與罹病的成蟲同時取食棕櫚時，也可能發生類似的方法而獲得傳播，且能由停留飼育地點將病毒傳給健康的幼蟲。極可能是其他昆蟲種類造成的感染，在防治有害幼蟲階段會有良好結果。

六、測試桿形病毒可能造成的生態危險

病毒可自行複製系統，故若大量釋入環境中而又會感染非目標昆蟲時，則很難防治或予以根絕。已有許多報告建議有關對病毒安全測試步驟做為決定生態潛在危險是絕對必要。其中以世界衛生組織⁽²⁹⁾ Ignoffo⁽⁶¹⁾ 和美國環境保護局^(29,30) 安全測試較為重要。此項測試主要根據，可被接受和專家建議而做的決定。已有報告討論到大量施用濃縮劑量的昆蟲病毒病原造成的潛在危險^(14,113,127)。人類將病毒應用於昆蟲防治，已有一段很長的時間。因此預料病毒極可能也會侵犯脊椎動物。特別是以昆蟲為主要食料的脊椎動物，將會無以計數情況下食入昆蟲病毒。感染能否經由此種暴露而濃縮，吾人則未明瞭。不過，由於潛伏或不明顯的感染可在不知不覺中一直進行，就是連真正感染所引起昆蟲溫和

程度的棲羣瓦解或生理衰弱現象也不太容易測出。

若取用昆蟲病毒以殺死主要經濟作物害蟲，無可避免的，人及其他非目標動物也會暴露在病毒之下，此觀念已被接受。顯然地，暴露的程度全賴所牽涉的昆蟲種類、昆蟲的棲所和地理區及應用的方法。在處理區內，動物遭遇的危險是由病毒的劑量及內在專一性所定。作物處理區內動物所冒的危險將比較普及且被目標區域內病毒擴散的程度所左右。如此的擴散主要受施用的方法、捕食天敵糞便所造成的移動、口器部分的污染或寄生天敵產卵器，氣候因子如風和雨水的影響。

若要將病毒當做藥劑一樣使用，則必須計算所冒之風險。最重要的考慮，乃在於如何確定其潛在危險，爾後設計出合適的安全測試步驟，如此方能測出風險的程度。在測試脊椎動物對病毒的敏感性時應就如下之因子做考慮：體溫、病毒劑量、種類、年齡和曝露期間。作者認為，當昆蟲病毒被證實能感染脊椎動物細胞。即會發生個體發生 (oncogenic) 和致畸變 (teratogenic) 效應的問題。這可能促成昆蟲病毒和脊椎動物病毒之間基因再組合。反覆的將脊椎動物曝露在昆蟲病毒，或持續將病毒經過胃內或呼吸器官，則會導致病毒產生突變品系，或可能造成病毒顆粒棲羣中選汰出異常型。雖已知研究昆蟲病毒變異潛能的方法，但其可行性並未加以探討⁽⁹⁴⁾。

任何大規模的施用昆蟲病毒時，顯然許多脊椎動物包括人在內，都會曝露在此污染下。其重要的路徑是呼吸道、胃腸道、皮膚和眼睛。此曝露的影響可能會造成病毒的侵入而引起過敏，或毒性的反應。此種毒性或過敏，可能會由病毒配製時滲入其他物質引起，特別是不純製品中滲有昆蟲蛋白質結果。

呼吸道遭到的危險，則是吸入由傳統噴霧器所噴出小滴 (droplet)。野生動物可能原本就曝露在含病毒的自然煙霧下，故不受吸入任何機械方法造成的小滴的影響。當病毒以噴霧小滴或是細粉形態施用，呼吸器官遭受危險的程度及引起病徵之型態，不僅受小滴或顆粒大小之影響，同時更受到吸入劑量之左右。顆粒在 $10\mu\text{m}$ 以上將會停留在上呼吸道，顆粒小於 $5\mu\text{m}$ 的能穿過較深層的組織，如微氣管⁽¹²⁸⁾，這些小顆粒可懸浮在空氣中一段很長的時間，可藉空中氣流散布至很遠的距離。水懸粉在噴霧中很快就乾燥，但真正的自然乾燥時間全視

相對濕度和噴灑設備內固體的分佈情況而定。在此情況下，病毒的感染力和穩定性強烈地受到太陽雷射，相對濕度和高溫的影響。當使用油類懸浮液時，蒸發困擾較少了。

脊椎動物取食時可能食入桿形病毒，如家畜極易嚙食到沾染到病毒的葉片，在此事例中，應多考慮多角體包涵體在胃腸道的命運。在脊椎動物胃中酸性情況下極可能不利於病毒的穩定性。但吾人不應忘記病毒可能有機會去感染鼻咽喉組織的細胞再進入胃部，例如包在核多角體包涵體內的顆粒體能在鳥的胃內保存其感染力。有關此問題的實驗結果，曾有學者做一整理。且相當明顯的，捕食鳥在攝食罹病的幼蟲後排出含大量具感染力的病毒⁽⁵⁸⁾，換言之，當哺乳類食入桿形病毒，病毒穿過胃則會不活化^(64,99)。此情況與前述病毒在胃內被消化情形相反。而人類食用經病毒處理之作物也同時食入核多角體，因作物有時會因自然疫病發生而被污染，但昆蟲病毒在人類之作用與鳥類作用相同。

不過在施放病毒的操作員及剛巧在施用時間內進入處理區的動物及人類，眼及皮膚暴露在病毒下遭受危險的機會可能大增。

昆蟲病毒侵入的可能性只能用較廣略的實驗來測定，病毒能感染脊椎動物種類的證據存在時，即使無明顯的疾病發生，仍有潛在的危險。因為不明顯的或是亞臨床的感染存在並非無危險，他們可能為感染其他動物的帶毒者，且不明顯的感染可能由不同途徑之刺激而成為明顯的感染現象，這些危險性對先天的殘廢、營養不足、白血病、瘧疾和服用免疫抑制藥造成免疫抑制作用 (Immuno depression)，更增加不明顯感染成為明顯感染之嚴重性。世界上許多地區，尤其是熱帶地區，人們營養不良及免疫抑制造成的感染相當普遍。且更多的人們服用免疫抑制藥。在設計安全測試實驗時，顯然應將這種特殊的環境狀況予以考慮。

不管是何種形式的曝露，哺乳類都可能會發生過敏反應，實不容過於低估此反應。造成過敏可能因寄主昆蟲物質（如蛋白質，刺激性毛，urticating hair），或是污染物如微生物或是能用於製造病毒成品的物質而引起。有些重覆暴露會產生過敏反應，而被認為首次過敏反應的情形，而此反應乃為未能認知的前次暴露於測試物質或是抗原性相關過敏原所致。

至於產生毒性效應，乃可能是暴露在較高的劑

量之故，並非在少劑量而重覆多次曝露所引起。另一可能乃是於配置病毒的其他物質產生毒質而非病毒本身引起。不過也有人懷疑病毒製造過程中，含昆蟲寄主物質和污染的微生物也會產生毒質，故在製備成成品時，病毒的純化和有效的微生物清潔度標準應受限制。

美國環境保護局出版的建議安全測試的指導手冊，似乎不錯，但由於測試的冗長及價格的昂貴，此項測試仍是困難甚多。到現在自玉米穗蟲 (*H. zea*) 舞蛾 *L. dispar*，森林害蟲 *Autographa californica*，*Hemerocampa pseudotsugata*，斜紋夜盜 *S. littoralis*，夜盜 *S. exempta* 和葉蜂 *N. sertifer* 分離之桿形病毒已通過安全測試，同時也不會產生過敏現象或毒性反應。顯然建立免於毒性或過敏反應病毒是急待需要的。但如此足量安全桿形病毒之製造，必需基於測試方便簡便，否則此法即要廢棄。

桿形病毒感染脊椎動物的問題牽涉較廣，且答案難以令人滿意。主要乃是病毒經由口吸入，皮下或靜脈等路徑來測試脊椎動物對病毒的感受性是十分困難，在發病時，由於內部器官已顯出細胞病理效應，受測試病毒可一再分離，欲予評估就無問題。若無疾病發生時，內部器官正常，血中無病毒血症 (viremia) 發生，那麼測試病毒則該想到是由於以潛伏的形式出現低水平的亞臨床感染，或是病毒的基因座 (genoma) 與寄主系統結合。此種測試的問題，是此設計系統技術應能敏感至測出上述其中事項。脊椎動物細胞暴露在病毒也會產生同樣的困擾。假使桿形病毒，或釋出的病毒顆粒接種於這些細胞株，然後，假若會誘發明顯的細胞病理效應或斑 (plaque) 的形成，則很容易評估。雖然能成功的將桿形病毒接種在人類羊膜細胞上⁽⁵³⁾，且虹彩病毒能感染蝮蛇細胞⁽⁸⁶⁾，不過其結果仍待證實。

在脊椎動物桿形病毒對非感受性感染現象偵測系統未完全建立前，需提供比電子顯微鏡和螢光抗體方法以外更敏感的技巧，方足以測試此項病徵。兩種夜盜蟲 *S. littoralis* 和 *S. exempta* 的桿形病毒測試安全性時試圖提供這些方法加以測試。在測試脊椎動物過敏和毒性反應時，做內部器官和血液的採樣，血清採樣是測定抗體的產生和可能的病毒血症，肝、肺、腎和胃腸管，檢視其細胞病理效應，並以螢光抗體處理以測試此二種病毒。另一更

精細的，則是取內部器官的均質磨碎物，接種於 *S. frugiperda* 細胞株，則二種病毒皆能感染且複製。假若供試哺乳類發生感染和複製的現象，則表示感性昆蟲細胞系相當敏感，能測出低水平的感染在所有的測試動物都沒有發現病毒在其中複製，利用自昆蟲寄生衍生的敏感昆蟲細胞株為試驗系統，將可幫助偵測脊椎動物低水平病毒感染情形。

無疑地，當大量不同種類的桿形病毒提出申請註冊時，這表示已有滿意的安全測試系統可遵循。且對其整個生物的危險性較易評估。目前許多國家正設計法規來管理為被當做生物防治藥劑，桿形病毒的釋放並已投入大量的時間及金錢。在可預見的未來將會繼續下去。頗覺困擾的是遺傳學家曾建議利用桿形病毒於去氧核糖核酸中再組合實驗中，成為典型媒介病毒 (model vector)，但此舉可能改變桿形病毒專一性的步驟，因此無論可能性多微小，仍將遭受反對。

七、結 論

昆蟲致病病毒只能被當做整個綜合防治系統諸多防治因子之一，無疑的，使用病毒仍無法完全取代其他防治系統，包括化學防治在內。雖然近十年來，已有很好的進展，但至今有關桿形病毒的潛力仍未能完全瞭解。許多工作仍待我們努力去解決，頗令人振奮的，是有愈來愈多的病毒學家加入到這少人研究的行列，將來研究的需求，是廣泛的使用可信賴的診斷方法，增進發展及使用具感性的昆蟲細胞株，就生體內和生體外瞭解病毒的複製環，及探究不明顯或潛伏感染的現象。並深入探討另一羣昆蟲質多角體病毒的潛力及其可能引起的生態上的危險。

誌謝 本譯文承本中心陳秋男博士、謝豐國博士和王順成先生之鼓勵指導得以完成，謹致衷心謝忱。

引用文獻 (略)