

本土蘇力菌研發及應用

曾 經 洲

農業藥物毒物試驗所 生物藥劑組

一、前言

二、生產安全衛生的農產品

三、蘇力菌的用途

四、蘇力菌的作用機制

五、蘇力菌的研發技術

六、田間有效應用蘇力菌技術

七、蘇力菌與抗藥性

八、研發蘇力菌基因轉殖生物與抗藥性管理

九、結論

一、前言

蘇力菌是一種昆蟲病原細菌，會產生殺蟲結晶毒蛋白，具有專一性的殺蟲效果，對目標昆蟲以外的生物完全無作用，是一種安全又無殘毒，又環保的植物保護劑。

自古人類為了栽培作物的增產，即利用自然的方法，或自然界中可得之物質來防治害蟲。到了二次大戰後，將為戰爭而發展的化學戰劑，轉移開發為植物保護和平用途，於是有了合成殺蟲劑，如有機氯、有機磷、胺基甲酸鹽、合成除蟲菊等。

傳統農藥的使用已破壞生態系統平衡，並產生抗藥性的問題，以致某些害蟲發生猖獗，造成很大的防治困難及損失。應用生物性殺蟲劑是為一良好解決之道，其中蘇力菌已商品化，而蘇力菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)之產品，也在過去數十年中出現，使用簡便又安全。

蘇力菌的殺蟲結晶蛋白對特定的昆蟲具毒效，但對哺乳動物、鳥類、害蟲的天敵、蜜蜂等均無害。其可製成一種安全，又無殘毒的生物性農藥，符合消費者健康，以及環境保護的要求。

在過去，蘇力菌產品僅用於防治鱗翅目某些害蟲，但近年來，科學家找出許多的蘇力菌殺蟲基因，並研製成重組基因產品。而許多新發現的蘇力菌品系，其殺蟲範圍超越傳統市售產品。

本所(行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所)利用快速鑑別蘇

力菌殺蟲基因之方法，大量篩檢本土蒐集之蘇力菌，尋找許多蘇力菌菌株及新的殺蟲蛋白基因，配合生物活性篩檢之結果，選擇殺蟲效果良好之菌株，直接醱酵量產，另外也將新穎之殺蟲基因，進一步利用於生物技術選殖。

所篩到的本土蘇力菌菌株，不但合乎生態上利用本地天敵防治本地害蟲之要求；所發現的新穎殺蟲基因亦具學術意義。利用此自然資源所建立的生物技術產品，更具經濟價值。

使用本所採獲之本土菌株所帶之基因進行轉殖研究，將來發展出來的產品，在應用上不受國外的限制，將有助於本國蘇力菌生物技術產業的發展，因而造福農民，並維護消費者及環境的安全。

二、生產安全衛生的農產品

吉園圃的標章是水果蔬菜衛安全的記號，也是消費者為了追求健康，選購果蔬的依據。為符合此要求，在以藥劑防治害蟲的工作上，「生物性農藥—蘇力菌」是最佳的選擇。使用蘇力菌防治害蟲，可能會因施藥次數增加而較費工，及增加些許藥劑成本，但蘇力菌對於噴藥的人無傷害，為健康原由，應多建議他們使用蘇力菌，雖增加施用頻度，但並無中毒傷害之虞。而且使用蘇力菌也無安全採收期之限制，可隨時採收，對於講求不使用化學性農藥的有機化栽培，更是不可或缺的利器。

把握蘇力菌的特性，必可發揮

其優良的防治功能，達成「吉園圃」的目標，既能造福農民，亦能嘉惠消費者，又能使農業永續經營。

三、蘇力菌的用途

昆蟲為生物系統中的一員，當然也會罹患感染微生物的疾病，像細菌性、真菌性、病毒性等的疾病。

1911年石渡繁胤在大日本蠶絲會報，發表了家蠶猝倒病，同年Berliner報導從Thuringia地區的地中海粉螟幼蟲分離到病原菌，1915年將之命為蘇力菌(*Bacillus thuringiensis*)，揭開了人類認識及應用蘇力菌的序幕。

蘇力菌分布於全球七大洲，可從罹病昆蟲、昆蟲棲所、各種土壤、不同的植物葉片、植物源的材料、靜水和流水、海水、潮間帶的沖積物、牛犢之墊床和羊毛、陸生脊椎動物(哺乳類、爬蟲類和鳥類)的排泄物、活化污泥等許多地方分離出來。

蘇力菌是一種昆蟲病原細菌，為革蘭氏陽性桿菌，在營養缺乏或環境不良的時候，會進入不分裂的半靜止期，或分化形成孢子和殺蟲蛋白結晶。

一種蘇力菌品系，可產生一種或多種的殺蟲晶體毒蛋白(Insecticidal Crystal Protein, ICP)。這種結晶蛋白對某些生物有特殊的毒效，某一類的毒素會對某一些昆蟲有專一的毒性。各類蘇力菌毒蛋白間之類源關係，因其所產生之殺蟲毒蛋白結晶不同，特異性的殺

蟲對象也不同。

最主要的有四大類，第一類Cry1類是作用於鱗翅目(如蝶蛾類)的幼蟲；第二類Cry2類是作用於鱗翅目和雙翅目(如蚊子類)的幼蟲或單獨對雙翅目有效；第三類Cry3類是作用於鞘翅目(如甲蟲類)的幼蟲；第四類Cry4類是專門作用於雙翅目的幼蟲。

蘇力菌殺蟲範圍，在1904年只知道蘇力菌對鱗翅目有效，到1978年發現對雙翅目有效之菌株，1983年發現對鞘翅目有效之菌株，1985年發現對其他生物具毒效的菌株，如線蟲，尤其是反芻類寄生線蟲的卵及幼蟲和原生動物、扁蟲、蠕類，1991年又發現對螞蟻有毒效的菌株。目前我國所有上市之蘇力菌產品，只有針對防治鱗翅目害蟲或雙翅目害蟲之產品。

四、蘇力菌的作用機制

每一種的殺蟲晶體蛋白是由一多胜鏈(polypeptide chain)所構成的，殺蟲蛋白晶體未溶解和活化前時是沒有毒性的。當昆蟲吃下蘇力菌時，毒素晶體在昆蟲中腸高鹼性腸液(pH值>9)下，殺蟲晶體蛋白開始溶解，此時胜鏈被在蛋白酶(protease)的作用下，被分解成前毒素(pro-toxin)，再活化變成毒素(toxin)，這些具有活性的毒素分毒性區域和細胞結合區域，細胞結合區域和昆蟲腸壁細胞的受器結合，毒性區域插入細胞膜，當有數個結晶毒蛋白插入時(通常6個或以上)，則迫使細胞形成一破孔，導致

失去調節鈉—鉀泵之功能，亦即滲透壓失去平衡，接著細胞破裂，而造成昆蟲腸道崩解死亡。這種活化的過程，是殺蟲晶體蛋白表現很高特異性的主要原因。

蘇力菌產品對人、牲畜、鳥類這些高等動物，晶體蛋白是不容易被活化的，所以並沒有毒性，因為惟有昆蟲幼蟲的中腸腸液pH值往往是在9以上。對其他昆蟲類也沒無毒性，因為沒有細胞受器可以結合毒素，也就發揮不作用。蘇力菌對脊椎動物除了不會被活化及沒有細胞受器外，食入或吸入時亦無害，尤其哺乳動物的胃酸可以破壞之，孢子不會在肺中發芽，不會造成病害，大量吸入時所造成的反應，僅如同一般無害異物粒子大量入侵之反應，是一種安全又無殘毒的生物性農藥，也是符合消費者健康，以及環境保護要求的殺蟲劑。

五、蘇力菌的研發技術

因應蘇力菌的菌株篩檢鑑定，本所亦建立各種蘇力菌菌株鑑定技術：

(一)菌種分離與孢子培養實驗

可能含蘇力菌之塵土樣品以熱及加抗生物質之方法處理，菌液之孢子經無菌水懸浮稀釋，在NA平板培養基培養至產生結晶。

(二)結晶形態的觀察

將蘇力菌培養至穩定期，使其產生足夠量的殺蟲毒蛋白(ICP)結晶，在光學顯微鏡或電子顯微鏡下觀察結晶形態，可分成雙金字塔型，如*Bt kurstaki*；扁平型，如*Bt san*

diego；圓型，如*Bt israelensis*；還有立方型及其他不正型等。

(三)核酸聚合酶連鎖反應(PCR)

以分子生物技術，萃取蘇力菌質體之去氧核糖核酸(DNA)，以聚合酶連鎖反應技術，加入已知基因的引子(primers)，快速鑑定其所含已知殺蟲毒蛋白基因(*cry-gene*)種類。

再利用聚合酶連鎖反應產物之限制酶剪切片段多態型(PCR-RFLP)技術，發現所帶未知的*cry*基因。

(四)SDS-聚丙稀醯胺膠體電泳分離 (SDS-PAGE)

將蘇力菌培養至穩定期之蘇力菌，所產生足夠量的毒蛋白，進行變性電泳分離，求其分離得之毒蛋白分子量，比對已有資料，得知其類別；並自胺基酸數目所推得之分子量作比對，獲知所屬類別。

(五)血清型免疫反應

利用蘇力菌鞭毛抗原血清，對菌體進行酵素聯結免疫雜合反應(ELISA)，可測知樣品之血清型(*serovar*)。

(六)高效液相色層分析

純化之蘇力菌毒素，以高效液相色層分析儀(HPLC)分析其滯留時間及豐度，知其毒蛋白種類及含量，並且可分別出 β -外毒毒。

(七)生物活性檢定

是毒效評估最重要的一環，也是蘇力菌對目標昆蟲真正毒效的表現。將蘇力菌樣品培養成適當的樣品，處理在目標昆蟲活體上，進行生物活性檢定，以得知可防治目標昆蟲種類及其毒效程度。

六、田間有效應用蘇力菌技術

蘇力菌具有以下之特性，因此蘇力菌在田間使用上，應注意以下幾點：

(一)蘇力菌在田間應用時，因毒素為非接觸性毒效，需要被昆蟲吃下進入中腸，在高鹼性下才會被活化，所以效果比接觸稍慢，但一旦活化發生作用，中毒的昆蟲很快就停止取食，呈現麻痺狀，雖未見立即死亡落下，但也不再為害作物。

(二)單獨使用蘇力菌產品，在作物栽培的早期，蟲害發生不嚴重時，即適合使用。但若遇害蟲發生嚴重，一時無法控制，在無殘毒顧慮的情況下，可以使用其他的農藥，先將害蟲族群壓下，再換回使用蘇力菌。到了栽培後期，尤其接近採收期時，為確保果蔬安全無殘毒，就要避免化學藥劑，而用蘇力菌。

(三)蘇力菌具專一性，只對付某類昆蟲，不會傷害其他生物，可以和天敵配合來使用。例如蘇力菌 *Bta*、*Btk* 產品，僅對付鱗翅目昆蟲，像寄生性的寄生蜂、捕食性的草蛉等害蟲的天敵，就不受其毒害。因此蘇力菌和天敵可以互相配合達成綜合防治(IPM)之目的。惟需注意不同品牌產品製劑配方，有無添加不良於天敵之成份。

(四)蘇力菌本身怕日光照射，易受紫外線破壞。紫外線在中午12點至下午2點間最強，因此除非是陰天，否則晴天應在午後3、4點以後，亦即黃昏時刻，使用較恰當，

尤其是夏天及紫外線指數偏高的地區，以免蘇力菌受日光的紫外線破壞而失去毒效，使用後夜晚來臨時，害蟲出來取食就中毒。

另外，因施藥後的每日，殘留在葉片的蘇力菌，仍會受日光、溫度等環境因子的影響，而在3、4天內迅速失效，不像一般化學性殺蟲劑，普遍地殘效性較長，因此需觀察害蟲的發生情形，在幼蟲繼續發生時持續使用。

(五)因蘇力菌對昆蟲成蟲沒有毒效，又沒有殺卵效果。使用後成蟲仍會繼續產卵，而且卵也會繼續發育，所以，隔幾天又有幼蟲孵化出來時，應該再使用。

(六)一般蘇力菌產品製劑，不含展著劑成份，因此在做葉部噴灑時需添加展著劑使用，增加蘇力菌在葉片上之附著，使昆蟲更容易取食到，殺蟲效果會較好。

(七)蘇力菌不具移行性，不能滲透入植物組織，要對付葉部害蟲，不能由根際施藥，除非是對付根部地下害蟲。

(八)不必如同一般殺蟲劑加入醋或酸，以提高殺蟲藥效，因毒素要在昆蟲高鹼性的腸道才能被活化，太酸性可能對此作用有礙。

(九)蘇力菌產品在水中呈懸浮狀，噴施使用中，應繼續搖動或攪拌，以維持有效成份的均勻懸浮，增加分散之效果。

(十)對付蔬菜上同一類的害蟲，單獨使用蘇力菌，即可獲得良好的防治效果，但若是為了防治其他不同類的害蟲，例如，以蘇力菌防治甘藍小菜蛾及紋白蝶，可是又有蚜

蟲發生時，則可以配合其他防治蚜蟲之化學性殺蟲劑使用，但需注意配合非蘇力菌之其他藥劑的安全採收期。

(十一)蘇力菌要保存在陰涼處，才不會迅速失效，若能低溫冷藏保存，則藥效更可以獲得最佳的保持。

七、蘇力菌與抗藥性

蘇力菌產品生產方便，可以快速大量製造，使用上與一般殺蟲劑一樣，容易操作。蘇力菌製成傳統農藥劑型的產品，施用後一段時間即由田間消失，不會讓選汰壓力持續存在於田間，刺激抗藥性的快速產生。根據全球的蘇力菌使用綜合檢討，蘇力菌在全球並無真正的抗藥性產生，偶有疑似狀況，根據調查研究，均屬於特殊不當操作模式所造成的結果。即或有害蟲對某菌株產品產生抗藥性，也可另以其他不同基因型的優良菌株替代。

八、研發蘇力菌基因轉殖生物與抗藥性管理

1984年進入了蘇力菌內毒素基因轉殖植物的時代。蘇力菌內毒素產生的基因位於質體上，容易進行轉殖，第一代的蘇力菌雖已發展到重組毒素基因，但大都限於單一基因，而第二代的蘇力菌則進入利用多重毒素基因，或差異很大的基因，甚而作成嵌合基因，以圖增強殺蟲效果、擴大殺蟲範圍，或改良蘇力菌本身對不良環境的抵抗力

等。第三代則將蘇力菌殺蟲毒蛋白基因轉殖入植物體，作成轉基因抗蟲作物。

開發生物性農藥或基因轉殖產品時，我們都必須考慮到對農業、社會的衝擊，期望所製作的是一安全又有效的溫和工具，在納入害蟲綜合管理(IPM)體系時，能維護生態系的平衡，也惟有如此，該防治工具才可以長久被有效使用。因此在蘇力菌的發展上，到底是要篩選、蒐集更多的野生蘇力菌菌株?或製作蘇力菌殺蟲基因的轉殖微生物?或製作蘇力菌殺蟲基因的抗蟲轉殖植物呢?

從自然環境中去分離篩選更多基因不同、殺蟲效力良好、殺蟲範圍更廣的野生蘇力菌菌株而直接利用之，是比改造遺傳基因，轉殖到微生物或植物為較容易的。在臺灣此一高溫多濕，又涵蓋了熱帶雨林、落葉林、針葉林到高山凍原的環境，在過去幾年內，已採集篩選得許多殺蟲基因組成與進口蘇力菌不同的菌株，且其殺蟲活性良好的菌株，此策略合乎生態學上，利用本地天敵防治本地害蟲之原則。

將蘇力菌殺蟲毒蛋白基因，經人為誘變或遺傳基因改造，轉殖到細菌、真菌或轉殖回蘇力菌中，可以在較短的時間內完成。經由不斷地改造，選殖出許多例如單一基因、新基因、複合基因、結合其他調控基因的變異菌株，可以因應害蟲抗藥性的產生，而不斷推出新的、不同的替代蘇力菌產品，而且

在生產及使用上，如同自然環境分離的蘇力菌一般，也較不會刺激抗藥性的快速產生，是抗藥性管理上的良好模式。但人為遺傳基因改造之途是較從自然環境分離蘇力菌為艱苦的。

若作成抗蟲轉殖植物，要將蘇力菌原核細胞的基因，轉殖入目標植物的真核細胞，而再生成植株，獲得良好的毒性表現，且可以適應生長，又能維持良好的農藝性狀，並且遺傳給後代，是不容易的。但是一旦推廣種植，則可以省卻農民購藥成本及施藥人工，惟此一持續的選汰壓力，可能會造成害蟲抗藥性的快速產生，而且可能趕不及推廣新的抗蟲轉殖植物。

在害蟲產生抗藥性或抗蟲轉殖植物毒性表現不足時，有可能促使害蟲的激化現象(hormesis)產生，增加總生殖力，或有利於早期的生殖力，或在次致死暴露劑量下，增加存活率或提早成熟，在害蟲抗藥性管理上，不可輕視。

使用蘇力菌基因操作基因改造生物的優點有：具有安全使用的悠久歷史；較窄的殺蟲範圍；強大的殺蟲活性；單一基因，容易作轉殖工作；若轉殖入植物體，則可大為提高經濟效益；在害蟲未顯現危害植物前即殺死之；對植物內部或地下部有效。缺點為不易表現到有效濃度，且假以時日，仍有昆蟲抗藥性產生的疑慮。

因此，根據蘇力菌產物之管理策略研討會(1990)，所提出管理昆蟲抗藥性的策略，將會可能是未來避免基因改造生物產生抗藥性的重要管理準則：

(一)高劑量(high dose)殺死全部的昆蟲，不讓其有存活而可能產生抗藥性者。

(二)低劑量(low dose)，昆蟲並未致死，但存活得不好，而增加被天敵等攻擊的機會。

(三)輪替用藥(rotation)，將蘇力菌與化學殺蟲劑輪替使用。

(四)累積基因數量(stacked gene)，將多種抗蟲基因殖入目標作物中，以增加抗蟲的能力。

(五)取代(replacement)，若一基因已逐漸產生抗性，則趕快尋找另一有效可替代的基因轉殖之。

(六)庇護所(refugia)的設立，田間不完全栽培抗性品種，仍保留部份感蟲品種，令感性品種上的無抗性蟲與抗性蟲進行雜交，繁殖競爭等，降低抗性蟲發生的機會。

九、結論

開發我國本土性蘇力菌，用以控制本土主要作物害蟲，可減少傳統農藥的使用，保護生態系統，並可減少對進口該產品的依賴，厚植我國生物技術產業，提升我國在世界貿易組織的競爭力。