

利用基因型鑑定策略發現有效殺蟲活性 之台灣本土新型蘇力菌 *cry1C* 基因

林志輝 吳淑盆 高穗生 曾經洲*

台中縣霧峰鄉 農業委員會農業藥物毒物試驗所生物藥劑組

(接受日期：中華民國 91 年 9 月 20 日)

林志輝、吳淑盆、高穗生、曾經洲* 2002 利用基因型鑑定策略發現有效殺蟲活性之台灣本土新型蘇力菌 *cry1C* 基因 植保會刊 44：233—244

夜蛾科中 *Spodoptera* 屬的蛾類幼蟲危害農作物甚嚴重，例如甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) 幼蟲在北美洲可侵害至少 18 科，約 90 種的植物，其中多半屬於作物。據美國方面在 1998 年的統計，平時約有 206 萬公頃的棉花田因甜菜夜蛾的侵害而損失約 1920 萬美元，平均每公頃棉花田損失約 9.3 美元，而在疫情爆發的高峰期 (outbreak)，每公頃棉花田的損失則可高達 917 美元，施用殺蟲劑的費用則達到每公頃 109 美元⁽⁶⁾；另外，*S. frugiperda*、*S. littoralis* 分別在美洲與非洲的危害也相當嚴重^(8,9)。同屬於 *Spodoptera* 屬的斜紋夜盜 (*S. litura*) 幼蟲在亞洲地區則是危害作物相當嚴重的主要害蟲，根據澳洲國際農業研究中心 (The Australian Centre for International Agricultural Research, ACIAR) 在 1997 年的調查指出，位於赤道南北兩側的西南太平洋 18 個國家或地區中，危害農作物的 *Spodoptera* 屬蛾類幼蟲主要有三種，分別是 *S. exempta*、*S. mauritia*，以及斜紋夜盜；其中斜紋夜盜的危害，在綜合各國近百種無脊椎農業害蟲的分佈與防治重要性統計中，排名第 3⁽²¹⁾。由西南太平洋各國名列前十位的無脊椎農業害蟲相對重要性統計中指出，斜紋夜盜出現在 5 個國家的前十位重要無脊椎農業害蟲名單中，綜合各國前十位無脊椎農業害蟲的統計總排名，斜紋夜盜則是第 10 名，而且截至 1997 年，西南太平洋地區尚無成功的生物防治措施⁽²¹⁾。另外，在印度拉加斯坦省 (Rajasthan) 種植的黃豆於 2000 - 2001 年間爆發斜紋夜盜的疫情，影響面積達到 26 萬公頃，佔全印度作物總面積的千分之二⁽¹⁵⁾。以上顯示斜紋夜盜在亞洲的熱帶與亞熱帶地區是相當重要的農業害蟲。台灣地處西太平洋，島內危害農作物的 *Spodoptera* 屬蛾類幼蟲主要有二種，分別是斜紋夜盜與甜菜夜蛾幼

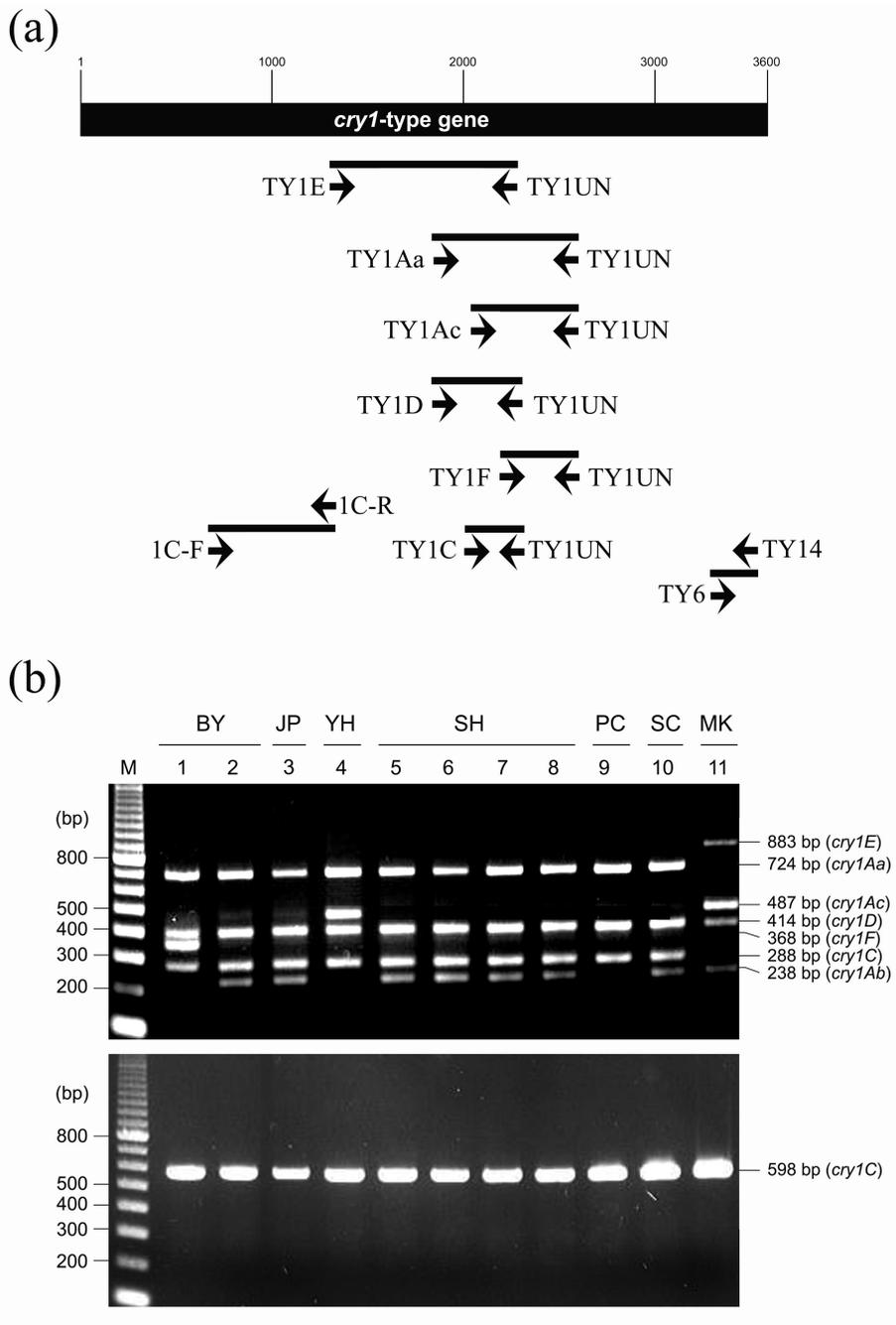
* 通訊作者。E-mail: cctzeng@tactri.gov.tw

附註：林志輝係國立中興大學農藝生物學研究所碩士候選人

蟲，其中斜紋夜盜幼蟲由於食性甚雜，大部分的蔬菜及早作均可受其危害，故全年均有疫情發生，其中六至十一月間較為嚴重⁽²⁾。

目前本省防治斜紋夜盜或甜菜夜蛾等 *Spodoptera* 屬蛾類害蟲的方法多半是使用化學性農藥⁽¹⁾，在非農藥的防治策略上則是利用黃色黏紙、性費洛蒙 (sexual pheromone) 或核多角體病毒 (nuclear polyhedrosis virus)，以及蘇力菌⁽²⁾。其中，蘇力菌殺蟲晶體蛋白 (*Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins, ICP) 之基因更常被運用於各種生物防治之案例中⁽¹⁹⁾。ICP 屬於昆蟲的腸內毒素，在蟲體的中腸道內受鹼性腸液與蛋白的活化，衍生的蛋白 N 端毒性部分與昆蟲腸道細胞膜上之接受器結合，造成腸細胞破裂、腸道穿孔，蟲體便停止進食而死亡⁽⁵⁾。由於單一蘇力菌株可產生多種不同類型的毒素蛋白，而不同類型 ICP 可防治不同之害蟲，例如 Cry1、Cry2 可防治鱗翅目害蟲，Cry2、Cry4 可防治雙翅目害蟲，Cry3 可防治鞘翅目害蟲等⁽⁷⁾，因此其適用性廣於目前其他非化學農藥之防治方式。

目前已知的蘇力菌 ICP 基因中，適合作為防治如斜紋夜盜等 *Spodoptera* 屬害蟲，基因種類為 *cry1C* 類型，且具有顯著之防治效果⁽²⁰⁾。在 2002 年 8 月 29 日，由英國的蘇力菌內毒素命名委員會 (The *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin nomenclature committee) 發佈之基因名單中，已公開的 *cry1C* 基因種類有 a、b 二類，其中 a 類有 8 種基因，b 類有 2 種基因。目前已由該委員會核定並公開的 *cry1* 基因型共有 108 種，佔所有核定蘇力菌 *cry* 基因總數 (228 種) 的 47.4%；其中，*cry1C* 型基因佔所有核定的 *cry1* 型基因總數的 9.3%，在所有核定蘇力菌 *cry* 基因總數中佔有 4.4%⁽⁴⁾。本所自台灣各農會穀倉中分離出蘇力菌種達 807 株，經由圖一(a)所示之 TY 系列的引子 (引子合成係參照文獻⁽¹⁰⁾所陳之序列)，以及覆合式聚合連鎖反應 (multiplex polymerase chain reaction, mPCR) 之檢定分析⁽¹⁰⁾，得到 15 株含有 *cry1C* 基因的菌種，約佔菌株總數的 1.9%。挑出其中 11 株菌株進行 mPCR 的重複試驗，得到結果如圖一(b)所示。由於 mPCR 引子 TY1UN⁽¹⁰⁾在 *cry1Aa*、*1Ac*、*1C*、*1D*、*1E*、*1F* 基因上均有結合序列，該序列在各基因間的位置距離轉譯起始密碼子 ATG 並不相同，故配合各基因特異的引子所得的 mPCR 產物片段亦有所不同，可在 2%瓊脂膠片的電泳試驗上區分片段大小。*cry1Ab* 的基因型鑑定 (genotyping) 則利用 TY6 與 TY14 引子⁽¹⁰⁾。將上述所有基因特異的引子 TY1Aa、TY6、TY14、TY1Ac、TY1C、TY1D、TY1E、TY1F⁽¹⁰⁾，以及共同引子 TY1UN (圖一 a) 混合，進行 mPCR 試驗。反應條件：前處理 95℃，3 分鐘，循環處理 95℃，30 秒、55℃，30 秒、72℃，30 秒，共 30 次，後處理 72℃，3 分鐘。mPCR 鑑定 11 株蘇力菌所含的 *cry1* 型基因結果列於表一，菌株得自台灣各地農會的穀倉，各系列來源依序如下：A06 系列的菌株分離自雲林縣 (Yunlin) 褒忠鄉 (Bauchung)、B07 系列分離自屏東縣 (Pingtung) 九如鄉 (Joru)、E05 系列分離自花蓮縣 (Hualien) 玉里鎮 (Yuli)、E10 系列分離自花蓮縣 (Hualien) 壽豐鄉 (Shoufeng)、G37 系列分離自高雄縣 (Kaohsiung) 美濃鎮 (Meinung)、I02 系列分離自彰化縣 (Changhua) 埔鹽鄉 (Puyen)、I30 系列的菌株則分離自彰化縣 (Changhua) 社頭鄉 (Shetou)；其中含 *cry1Aa* 的菌株有 10 株、含 *cry1Ab* 的菌株有 8 株、含 *cry1Ac* 的菌株僅 2 株，未見同時含 *cry1Aa*、*Ab* 及 *Ac* 基因的



圖一、利用覆合式聚合連鎖反應進行 *cry1* 基因型之鑑定⁽¹⁰⁾與 *cry1C* 基因之確認。使用於覆合式聚合連鎖反應的引子，計有近基因 5 端的 TY1E、TY1Aa、TY1Ac、TY1D、TY1F、TY1C，以及近 3 端的 TY1UN，在各式 *cry1* 基因型的相對位置如 (a) 所示。近基因 5 端的引子可同時與 TY1UN 引子聯合放大出 *cry1E* 基因上的 883 bp 局部片段、*cry1Aa* 基因上的 724 bp 局部片段、*cry1Ac* 基因上的 487 bp 局部片段、

cryID 基因上的 414 bp 局部片段、*cryIF* 基因上的 368 bp 局部片段，以及 *cryIC* 基因上的 288 bp 局部片段，如 (b) 所示。引子 TY6、TY14 則設計為放大 *cryIAb* 基因上的 238 bp 局部片段之用。引子 1C-F、1C-R 可檢驗 *cryIC* 的 a、b 二類基因，放大出基因上的 598 bp 局部片段，如 (b) 所示，作為檢驗 *cryIC* 基因的確認之用。引子序列詳見文獻⁽¹⁰⁾。

Fig. 1. The *cryI* genotyping by multiplex polymerase chain reaction (mPCR)⁽¹⁰⁾. Relative locations of 5' primers (TY1E, TY1Aa, TY1Ac, TY1D, TY1F, TY1C, and TY6) and 3' primers (TY1UN and TY14) on the *cryI*-type gene are shown in (A). Part of each *cryI*-type gene was amplified by one set of 5' and 3' primers in multiplex PCR as shown in (B), representing a 883-bp fragment for *cryIE*, a 724-bp fragment for *cryIAa*, a 487-bp fragment for *cryIAc*, a 414-bp fragment for *cryID*, a 368-bp fragment for *cryIF*, and a 288-bp fragment for *cryIC*. Primers TY6 and TY14 are unique for the amplification of a 238-bp fragment from the *cryIAb* gene. Primers 1C-F and 1C-R shown in (A), which resulted in the 598-bp fragment by PCR shown in (B), could facilitate the determination of the a- and b-types of *cryIC* genes better than the primers used for only the *cryICa* type in mPCR. All details of the primer sequences are presented in reference⁽¹⁰⁾.

菌株。含 *cryIE* 與 *cryIF* 的菌株各僅有 1 株，每株菌皆含有 *cryIC*、*cryID* 基因。在檢測的 7 個 *cryI* 型基因中，大部分的菌株皆含 4 個 *cryI* 型基因，G37-07a 菌株有 5 個 *cryI* 型基因，I02-01x 菌株則僅有 3 個 *cryI* 型基因。在圖一(b)中，除了 G37-07a 菌株外，各株皆可得到表示含有 *cryIC* 基因的 288 bp 片段，利用另一組偵測 *cryIC* 基因的引子 1C-F 與 1C-R⁽¹²⁾ 進行 PCR，顯示 G37-07a 含有 *cryIC* 類型的基因（圖一 b）。進一步檢視 *cryIC* 基因種類中的 a、b 類（*cryICa* 與 *cryICb*）基因序列的差異，發現 mPCR 中使用的 TY1C 引子無法黏合 b 類的 *cryIC* 基因，僅能黏合 a 類的基因，若搭配引子 TY1UN 進行 PCR，可得到 288 bp 的片段，而引子組 1C-F 與 1C-R 可黏合 a、b 二類的 *cryIC* 基因，進行 PCR 後可得到 598 bp 的片段，因此推測菌株 G37-07a 帶有 *cryICb* 之基因型。其他 10 株菌的 *cryIC* 基因型則為 *cryICa* 之基因型。

利用小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 三齡幼蟲進行 *cryI* 基因表現的生物檢定⁽¹¹⁾。取用未結球之甘藍葉片，雙面均勻噴灑含蘇力菌毒素蛋白之培養菌液，以測試上述 11 個菌株體內含有的 *cryI* 系列基因之殺蟲效果。發現蛋白濃度為 0.25 mg/ml 時，可使小菜蛾幼蟲在測試 48 小時後達到 93% - 100% 的死亡率（表一），顯示此 11 株菌的 *cryI* 型基因有豐富的蛋白質與生物活性表現。進一步利用斜紋夜盜三齡幼蟲測試此 11 株菌體內 *cryIC* 基因的殺蟲活性⁽¹²⁾。將菸草葉片之雙面均勻噴灑蛋白質濃度為 5 mg/ml 之菌液，使斜紋夜盜幼蟲取食處理葉面 24 小時後，改以無毒性之人工飼料持續餵飼供試蟲體，經 48、72、96 及 120 小時後，觀察各時間點的幼蟲死亡率，並於 120 小時後測定供試蟲體之平均重量。結果如表二所示，在餵食噴灑蘇力菌的菸草葉片 24 小時後，大部分的斜紋夜盜幼蟲皆未死

表一、不同來源下含有 *cryIC* 基因之台灣本土蘇力菌分離株的 *cryI* 基因組成與其對小菜蛾的殺蟲活性¹⁾Table 1. The *cryI* genotyping of the *cryIC*-containing *Bacillus thuringiensis* strains isolated from different sources in Taiwan and the insecticidal activity of each culture against diamond back moth (*Plutella xylostella*, DBM)¹⁾

Isolate	<i>cryI</i> ²⁾							Mortality (%)	Source ³⁾
	<i>Aa</i>	<i>Ab</i>	<i>Ac</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>F</i>		
A06-03x	+	-	-	+	+	-	+	93	Bauchung, Yunlin
A06-04x	+	+	-	+	+	-	-	100	Bauchung, Yunlin
B07-02a	+	+	-	+	+	-	-	100	Joru, Pingtung
E05-20a	+	-	+	+	+	-	-	100	Yuli, Hualien
E10-01a	+	+	-	+	+	-	-	100	Shoufeng, Hualien
E10-11a	+	+	-	+	+	-	-	100	Shoufeng, Hualien
E10-12a	+	+	-	+	+	-	-	100	Shoufeng, Hualien
E10-13a	+	+	-	+	+	-	-	100	Shoufeng, Hualien
G37-07a	-	+	+	+	+	+	-	100	Meinung, Kaohsiung
I02-01x	+	-	-	+	+	-	-	100	Puyen, Changhua
I30-13a	+	+	-	+	+	-	-	100	Shetou, Changhua
CK ⁴⁾	-	-	-	-	-	-	-	0	-

¹⁾ Data collected after 48 h of treatment. Thirty third instar larvae were assayed for each isolate. The protein concentration used for each treatment was 0.25 mg/ml. The cabbage leaf area was 20 cm².

²⁾ The *cryI*-type gene contents were detected by multiplex PCR using *cryI*-mixed primers as described in text.

³⁾ The source of each isolate refers to the location of the cereal storage house of each local farmer's association.

⁴⁾ CK: Larvae were fed with the leaves which had been sprayed with distilled water only.

亡，其後更換成不含蘇力菌液的人工飼料，以便觀察蟲體進食蘇力菌液 24 小時所造成之殘毒效應。48 小時後開始有 2 株菌 (A06-04x、E05-20a) 造成大於 10% 的幼蟲死亡率；72 小時後有 7 株菌造成大於 10% 的幼蟲死亡率，其中有 3 株菌 (A06-04x、E10-12a、I02-01x) 更造成大於 20% 的幼蟲死亡率；96 小時後有 7 株菌造成大於 20% 的幼蟲死亡率，其中有 4 株菌 (A06-03x、A06-04x、E10-12a、I02-01x) 更造成大於 30% 的幼蟲死亡率；至 120 小時後有 6 株菌造成大於 30% 的幼蟲死亡率，其中有 4 株菌 (A06-03x、E10-12a、E10-13a、I02-01x) 更造成大於 40% 的幼蟲死亡率，A06-03x 菌株更造成高達 63.3% 的幼蟲死亡率。若將餵食以無菌水處理菸草葉片的對照組蟲體平均體重 (112.3 mg) 作為 100% 的成長指標，則取食含蘇力菌液之菸草葉片 24 小時後再持續餵食無毒人工飼料達 120 小時的斜紋夜盜幼蟲之相對體重 (relative weight) 僅達對照組的 2.7% - 27.9% (圖二 b)，顯示食用供試蘇力菌液將造成蟲體生長遲緩，由圖二(a)即可看出蟲體變

表二、含有 *cryIC* 基因之台灣本土蘇力菌分離株對斜紋夜盜幼蟲之殺蟲活性¹⁾Table 2. Insecticidal activity of *cryIC*-containing *Bacillus thuringiensis* Taiwan isolates against the larvae of the tobacco cutworm (*Spodoptera litura*)¹⁾

Isolate	Mortality (%) ²⁾					Larvae weight after 120 h (mg) ³⁾
	Time after treatment (h)					
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	
A06-03x	0	6.7	13.3	36.7	63.3	3.1 ±0.4
A06-04x	0	16.7	23.3	30.0	30.0	5.4 ±0.8
B07-02a	3.3	6.6	16.7	20.0	26.7	7.2 ±1.6
E05-20a	0	10.0	10.0	23.3	36.7	11.9 ±2.3
E10-01a	0	0	0	0	0	17.4 ±2.2
E10-11a	0	0	10.0	13.3	16.7	13.3 ±1.0
E10-12a	0	0	20.0	33.3	46.7	3.0 ±0.1
E10-13a	3.3	3.3	3.3	26.7	46.7	10.6 ±1.9
G37-07a	0	0	3.3	10.0	10.0	13.6 ±1.8
I02-01x	0	3.3	20.0	36.7	40.0	13.9 ±2.4
I30-13a	0	0	0	10.0	10.0	31.3 ±4.4
CK ⁴⁾	0	0	0	0	0	112.3 ±0.2

¹⁾ Thirty third instar larvae were assayed for each isolate.²⁾ The protein concentration used for each treatment is 5 mg/ml. The tobacco leaf area was 45 cm².³⁾ The weight of surviving larvae was measured at the end of treatment.⁴⁾ CK: Larvae were fed with leaves which had been sprayed with distilled water only.

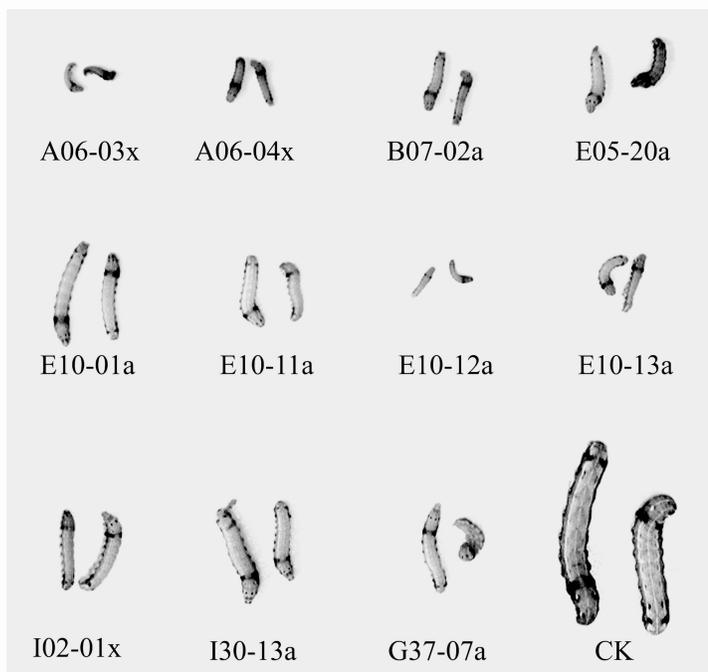
化的明顯差異。觀察圖二(b)中，各菌株間造成供試蟲體平均重量在 120 小時後的相對差異與幼蟲死亡率（表二）之間的關聯性，雖然約略可呈現造成死亡率愈高的菌種，愈容易抑制蟲體生長的現象，但其間之絕對關聯性並不強，例如同樣造成供試幼蟲死亡率達 46.7% 的菌株 E10-12a、E10-13a，抑制蟲體的生長效能即有 3 倍以上之差別。但若以相對體重小於 10%、介於 10% – 15%，以及大於 15% 為區間參數（圖二 b），統計各區間的菌種所造成的平均死亡率，顯示造成相對體重成長小於 10% 的菌株（A06-03x、A06-04x、B07-02a、E10-12a、E10-13a）所造成的平均死亡率為 42.7%，標準誤差（standard error）為 6.6%；造成的菌株（E10-01a、I30-13a），所造成的平均死亡率則為 5%。由此指出死亡率與抑制蟲體之生長仍亟具相關性。此外，不同菌株造成蟲體生長遲緩的程度亦可能與毒性的發揮造成較早死亡或死亡率急速上升有關聯，例如相對體重僅成長 4.8% 的 A06-04x 菌株，雖然在 120 小時後僅造成 30% 的死亡率，但在 48 小時即可造成 16.7% 的死亡率，是該時間點出現的最高死亡率；或者是相對體重成長僅達 2.8% 的 A06-03x 菌株在 72 小時至 96 小時之間死亡率攀升近 3 倍。相對體重成長僅達

2.7%的 E10-12a 菌株，在 48 小時至 72 小時之間死亡率由 0%急速上升至 20%，是所有菌株由 0%的死亡率開始造成幼蟲死亡的最顯著者，其次就是上述提及，相對體重僅成長 4.8%的 A06-04x 菌株，是在 24 小時至 48 小時之間死亡率由 0%上升至 16.7%。綜合上述結果顯示斜紋夜盜幼蟲對不同菌株產生的 *Cry1C* 蛋白具有不同程度的敏感性 (sensitivity) 或耐受性 (tolerance)，可能與 *cryIC* 基因的種類或基因表現有關。若能發現造成死亡率偏高、延緩蟲體重增加，以及毒性提早發揮的基因種類，則依照斜紋夜盜具有互殘的個性，新基因即使未能達成 100% 的死亡率，也能控制害蟲族群，降低疫情爆發之機率。

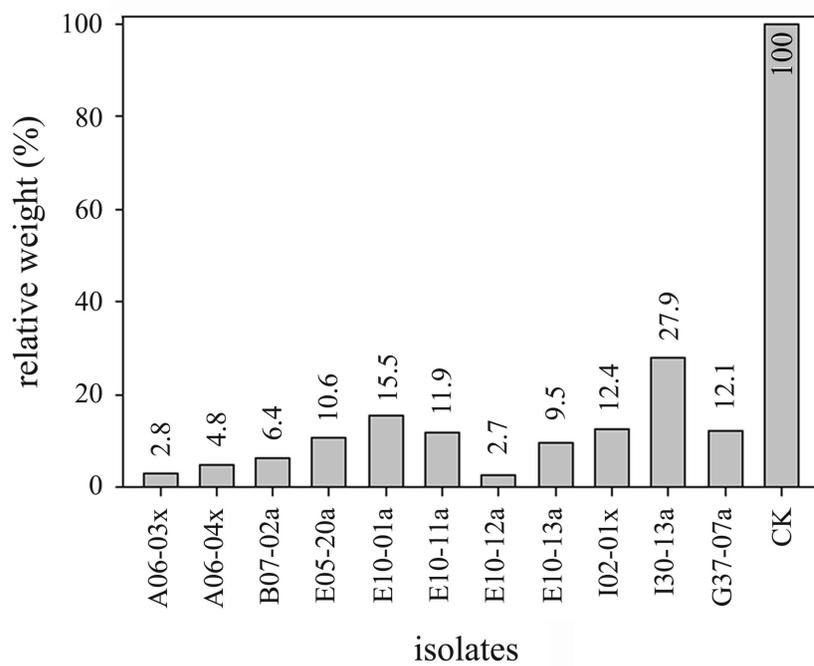
cryIC 基因種類的發掘，自 1988 年由 *B. thuringiensis entomocidus* 60.5 菌株選殖出的 *cry1Ca1*，至 2001 年由中國的 *B. thuringiensis* c002 菌株選殖出的 *cry1Ca8*⁽⁴⁾，經 VNTI 軟體 AlignX (Informax Inc., North Bethesda, MD, USA) 之分析，其共同已知之 DNA 序列相同性 (identity) 為 99.4%，若比較共同已知之蛋白質序列，則相同性為 98.3%。以 *cry1Ca1* 基因為例，其與已知的 *cry1Ca* 型基因之 DNA 序列差異僅在 0.1% – 0.5% 之間，蛋白質序列差異則在 0.2% – 1.3% 之間。1993 年發掘的 *cry1Cb1* 基因是選殖自 *B. thuringiensis galleriae* HD29 菌株，此 b 類型基因與 a 類之差異較大，例如 *cry1Cb1* 與 *cry1Ca1* 基因在 DNA 序列相同性的差異為 13%，在蛋白質序列上的差異則為 15.4%，差異較顯著的區域則分佈在第 458 – 604 個氨基酸之間。

由 PCR 引子組 1C-F、1C-R 進行基因型鑑定時，所得的 598 bp 片段則涵蓋第 227 – 426 個氨基酸之區間，其中第 317 – 320 個氨基酸 (G-R-N-F)，以及第 374 – 377 個氨基酸 (Q-P-W-P) 在殺蟲晶體蛋白的三度空間立體構型上屬於裸露在分子表面上的環狀 (loop) 構型，被認為可能與殺蟲活性或防治對象的特異性有關⁽¹⁶⁾。此外，位於 PCR 引子組 1C-F、1C-R 之間的 DNA 序列在 *cry1Ca1*、*cry1Ca2*、*cry1Ca3* 與 *cry1Ca4 – 6* 基因之間有所不同，因此使用引子組 1C-F、1C-R 進行 11 個菌株所含 *cryIC* 型基因鑑定時，所得的 598 bp 片段序列可用來判讀其類似何種 *cry1Ca* 型的基因。本試驗由表二的結果中選出殺蟲效果在 120 小時後可大於 20% 的 7 個菌株，利用引子組 1C-F、1C-R 分離此 598 bp 片段，並選殖於大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 的質體中，進行雙向定序分析，以便快速尋求具有殺蟲效果的新穎 *cryIC* 型基因。在 DNA 定序的結果中發現，由殺蟲效果達 36.7% 之 E05-20a 菌株中分離出的 598 bp 片段序列 (GenBank accession no. AF540014) 不同於目前任何已知之 *cryIC* 基因，變異位址在第 280 個氨基酸密碼子由 TCT 變為 TCC、第 288 個氨基酸密碼子由 AAC 變為 AAT，以及第 351 個氨基酸密碼子由 CCA 變為 CCG。由於變異位址同時呈現 Wobble 效應特徵 (即基因密碼子的第 3 碼變異不影響氨基酸種類) 與 Transition 效應特徵 (即核 酸的嘌呤之間互換或嘧啶之間互換)，研判不應為 PCR 反應之突變所造成，況且一般 PCR 反應的突變率為 0.1%，引子對 1C-R 與 1C-F 之間聚合放大之片段為 598 bp，突變率不到 1 bp，因此研判 E05-20a 菌株在此區間的 3 個變異位址非 PCR 反應造成，而應代表一新穎之 *cry1Ca* 型基因，其餘 6 個菌株之該 DNA 片段與 *cry1Ca4 – 6* 基因相同，顯示此 6 個菌株體內的 *cryIC* 基因應類似 *cry1Ca4 – 6* 基因，需進一步分析基因的其它區域序列，方能決定是否為新穎之 *cryIC* 基因。上述在高雄縣

(a)



(b)



圖二、含 Cry1C 蛋白之各菌株培養液對斜紋夜盜幼蟲生長的抑制效應。將菸草葉圓片雙面噴灑蛋白濃度為 5 mg/ml 的蘇力菌液，取之餵食 3 齡之斜紋夜盜幼蟲，計 24 小時，爾後以無毒之人工飼料餵食並觀察供試蟲體內蘇力菌殘毒造成的死亡率。120 小時後照相紀錄蟲體生長 (a)，並測量蟲體重量。計算餵食僅含蒸餾水葉片之對照組蟲體重 (CK)，以及各實驗組蟲體重，如表二所示。比較各實驗組與對照組蟲體重 (100%) 的比例，作為相對體重值 (relative weight, %)，如 (b) 所示，藉以評估 Cry1C 毒性與蟲體生長之關聯性。

Fig. 2. The inhibition effect of each Cry1C-containing *Bacillus thuringiensis* bacterial culture on the growth of *Spodoptera litura* larvae. The bacterial culture with 5 mg/ml of protein concentration was sprayed on both sides of a tobacco leaf disc. The treated leaf was fed to third instar larvae of *S. litura* for 24 h. Non-toxic feed was subsequently provided for the next few hours. Observations were made each 24 h on the influence of toxic residues in the larva's body on mortality, as shown in Table 2. After 120 h, larvae were weighed (results are shown in Table 2) and photographed, as shown in (A). (B) Growth inhibition of larvae was assessed using the relative weight, by comparing the average weight of each treatment with those which were only fed distilled water (CK). The average weight of larvae in CK was regarded as 100%.

美濃鎮農會穀倉分離到的菌株 G37-07a 可能是屬於 *cry1Cb* 類型之新穎基因，惟其殺蟲效果僅達 10% 死亡率，並不具實用的開發價值。此外，利用西方點式墨漬法 (Western dot blot) 與抗 Cry1C 蛋白之專用抗體檢測出 11 株菌體內的 *cry1C* 基因具有表現，惟需進一步定量分析，以便釐清基因種類、蛋白表現的質與量，以及殺蟲效果四者間之關聯性。

根據 Cry1C 蛋白在植物體內表現量達到可溶性總蛋白的 0.01%，即可造成 100% 的供試蟲死亡率^(3, 18)，可說明本試驗中的 11 株菌的 Cry1C 殺蟲晶體蛋白含量可能皆低於 0.01%，顯示有必要持續篩選新菌株。另外，菌種生態棲息地、基因組成，以及表現、調控的機制亦可能決定殺蟲晶體蛋白的有效活性⁽¹⁴⁾。在南美洲的巴西地區，利用 PCR 進行含 *cry1C* 基因的菌株篩選，顯示 *cry1C* 基因普遍存在於該地區的殺蟲強效與弱效的蘇力菌株中⁽¹³⁾，而本試驗中，由花蓮縣壽豐鄉農會穀倉分離出之 4 個菌株，雖皆含有 *cry1C* 基因，但殺蟲效果由 0% – 46.7%，亦極具差異性；此外，來自不同菌種但基因序列完全相同的 Cry1C，殺蟲活性也有極大之差別⁽¹⁷⁾。因此說明了利用 PCR 的快速分子檢定，須立即搭配殺蟲活性的生物檢定測試，方能有效地達成發現新穎基因之學術價值，以及基因具有良好殺蟲效果之產業價值的雙贏目的。總之，如何延續 PCR 快速的基因型鑑定結果，使新穎基因產生有價之生物活性，以及如何利用基因工程方法提昇新穎 *cry1C* 基因的表現量，將是持續研究 *cry1C* 基因的重要課題，也是未來開發其他種類抗蟲抗病基因的基本模式。

(關鍵詞：蘇力菌、殺蟲晶體蛋白、*cry1C* 基因、基因型鑑定、斜紋夜盜)

謝 辭

承蒙國立中興大學分子生物學研究所陳良築教授提供抗 Cry1C 蛋白之抗體 (Cry1C 蛋白表現自 *cry1Ca5* 基因, 僅含蛋白 N 端部分) 以及美國農業部 (USDA) 農業研究服務處 (Agricultural Research Service, ARS) 整合農耕與自然資源研究組 (Integrated Farming and Natural Resources Research Unit) 之 Dr. S. M. Greenberg 協助討論近二年有關甜菜夜蛾之研究心得, 謹此誌謝。本文編入行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所發表論著編號第 9103 號。

引 用 文 獻

1. 費雯綺、王玉美 編。2000。植物保護手冊。行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所 編印。台中。764 頁。
2. 劉達修、王雪香、杜德一。1997。葉菜類：十字花科。葉 10 頁。蔬菜病蟲害綜合防治專輯。行政院農業委員會、台灣省政府農林廳 編印。南投。
3. Christov, N. K., Imaishi, H., and Ohkawa, H. 1999. Green-tissue-specific expression of a reconstructed *cry1C* gene encoding the active fragment of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin in haploid tobacco plants conferring resistance to *Spodoptera litura*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63: 1433-1444.
4. Crickmore, N., Zeigler, D. R., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Bravo, A., and Dean, D. H. 2002. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html. (August, 29)
5. Gill, S. S., Cowels, E. A., and Pietrantonio, P. V. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxin. *Annu. Rev. Entomol.* 37: 615-636.
6. Greenberg, S. M., Sappington, T. W., Legaspi, Jr., B. C., Liu, T. X., and Setamou, M. 2001. Feeding and life history of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) on different host plants. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 94: 566-575.
7. Hofte, H., and Whiteley, H. R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53: 242-255.
8. Hosny, M. M., Topper, C. P., Moawad, G. M., and El-Saadany, G. B. 1986. Economic damage thresholds of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae) on cotton in Egypt. *Crop Prot.* 5: 100-104.
9. Hruska, A. J., and Gould, F. 1997. Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) and *Diatraea lineolata* (Lepidoptera: Pyralidae): impact of larval population level and temporal occurrence on maize yield in Nicaragua. *J. Econ. Entomol.* 90: 611-622.
10. Kalman, S., Kiehne, K. L., Libs, J. L., and Yamamoto, T. 1993. Cloning of a novel *cry1C*-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1131-1137.
11. Lin, C. H., Huang, W. C., Tzeng, C. C., and Chen, L. J. 2002. Insecticidal activity and plasmid retention of the epiphytic *Erwinia herbicola* strains transformed with the *Bacillus thuringiensis cryIAa1* gene. *Plant Prot.*

- Bull. 44: 21-36. (in Chinese)
12. Lin, C. H., Chang, M. L., Tzeng, C. C., and Chen, L. J. 2002. Co-transformation of the synthetic *cryIA(c)* and wild-type *cry1C* genes encoding *Bacillus thuringiensis* endotoxins into tobacco and the bipartite expression effect on insecticidal efficacy. Plant Prot. Bull. 44: 209-232. (in Chinese)
 13. Loguercio, L. L., Santos, C. G., Barreto, M. R., Guimaraes, C. T., and Paiva, E. 2001. Association of PCR and feeding bioassays as a large-scale method to screen tropical *Bacillus thuringiensis* isolates for a *cry* constitution with higher insecticidal effect against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. Lett. Appl. Microbiol. 32: 362-367.
 14. Martinez, C., and Caballero, P. 2002. Contents of *cry* genes and insecticidal toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains from terrestrial and aquatic habitats. J. Appl. Microbiol. 92: 745-752.
 15. Prasad, S. S. 2001. Country report for India. In: Meeting of the Programme Advisory Committee (PAC), November 26-28, 2001, Ayutthaya, Thailand. 9 pp.
 16. Smith, G. P., and Ellar, D. J. 1994. Mutagenesis of two surface-exposed loops of the *Bacillus thuringiensis* Cry1C δ -endotoxin affects insecticidal specificity. Biochem. J. 302: 611-616.
 17. Smith, G. P., Merrick, J. D., Bone, E. J., and Ellar, D. J. 1996. Mosquitocidal activity of the Cry1C δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. Appl. Environ. Microbiol. 62: 680-684.
 18. Strizhov, N., Keller, M., Mathur, J., Koncz-Kalman, Z., Bosch, D., Prudovsky, E., Schell, J., Sneh, B., Koncz, C., and Zilberstein, A. 1996. A synthetic *cry1C* gene, encoding a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin, confers *Spodoptera* resistance in alfalfa and tobacco. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 15012-15017.
 19. Van Rie, J. 2000. *Bacillus thuringiensis* and its use in transgenic insect control technologies. Int. J. Med. Microbiol. 290: 463-469.
 20. Visser, B., Munsterman, E., Stoker, A., and Dirkse, W. G. 1990. A novel *Bacillus thuringiensis* gene encoding a *Spodoptera exigua*-specific crystal protein. J. Bacteriol. 172: 6783-6788.
 21. Waterhouse, D. F. 1997. The major invertebrate pests and weeds of agriculture and plantation forestry in the southern and western Pacific. ACIAR Monograph No. 44, 99 pp.

ABSTRACT

Lin, C. H., Wu, S. P., Kao, S. S., and Tzeng, C. C.* 2002. Identification of novel *cryIC* genes from local Taiwan *Bacillus thuringiensis* isolates with effective insecticidal activity by genotyping strategy. Plant Prot. Bull. 44: 233-244. (Department of Bio-pesticide, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC)

The existence of the *cryIC* gene in 11 of 807 isolates of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) from Taiwan was verified within *cryI* genotypes by multiplex polymerase chain reaction (mPCR). Initially, the bioassay using 0.25 mg/ml of total proteins in *Bt* suspensions displayed the mortality rates among 93%–100% at 48 hours against the third instar larvae of *Plutella xylostella* (diamondback moth, DBM), showing the excellent insecticidal efficacy of the *cryI*-type genes. The *cryIC* gene is especially effective against the *Spodoptera* spp. which are important pests causing heavy crop damage and yield losses in tropical areas. To perform biological control targeting the *Spodoptera* spp., we focused on analyzing insecticidal activity caused by the *cryIC* gene in the 11 local isolates. Ambiguous mortality ratings of from 0% to 63.3% against the third instar larvae of *S. litura* (tobacco cutworm, TCW) implied that novel type of the *cryIC* gene might exist in some of the 11 isolates. To disclose novel types of *cryIC* genes in advance, a 598-bp fragment was amplified from all the isolates with higher mortality (> 20%) against TCW, and this was sequenced for further identification. The unraveled 598-bp DNA sequences have thus far shown their equivalence with published *cryICa4-6* genes except for one from isolate E05-20a which could cause 36.7% mortality against TCW. It would be worthwhile cloning the *cryIC* gene in isolate E05-20a, as a novel *cryICa*-type gene. According to PCR genotyping, another isolate, G37-07a, may contain the *cryICb*-type gene; however, the lower insecticidal activity (10%) against TCW may reduce its applicable value. Genotyping corresponding to both insecticidal activity and pest growth inhibition is also discussed.

(Key words: *Bacillus thuringiensis*, insecticidal crystal protein, *cryIC* gene, genotyping, *Spodoptera litura*)

*Corresponding author. E-mail: cctzeng@tactri.gov.tw