

本土蘇力菌基因之選殖及應用

高穗生* 謝奉家

台中縣霧峰鄉 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所生物藥劑組

摘 要

高穗生*、謝奉家 2003 本土蘇力菌基因之選殖及應用 植物保護學會特刊 新 5（植物保護管理永續發展研討會專刊）：249 – 258

蘇力菌的殺蟲結晶蛋白（delta 內毒素）對特定的昆蟲具毒效，但對人與哺乳動物等均無害。過去 50 年來，蘇力菌產品大多仍應用在農業與森林。法國在 1938 年製造出第一個蘇力菌產品，全世界目前以蘇力菌為基礎的產品超過 100 種，佔整個生物殺蟲劑市場的 90 % 以上。蘇力菌產生之殺蟲結晶蛋白不同，殺蟲之對象亦互異，過去大多用於防治鱗翅目、雙翅目和鞘翅目之某些害蟲，但近年來，蘇力菌株已被研製基因轉殖產品（轉殖微生物，轉殖植物等），另發現對線蟲及動物寄生蟲具有抑制活性。由於持續有新的蘇力菌菌株與毒蛋白基因被篩選分離出來，現今，全球已分離定序出至少 170 個蘇力菌殺蟲基因。本文分別針對蘇力菌殺蟲結晶蛋白基因之分類，台灣本土蘇力菌菌株的篩選，台灣本土蘇力菌基因之選殖和表現，蘇力菌基因轉殖微生物，蘇力菌基因轉殖植物，蘇力菌面臨問題與未來展望，提出相關說明與探討。

（關鍵詞：蘇力菌、殺蟲結晶蛋白、選殖與表現）

緒 言

由於社會大眾對環保意識的覺醒，生物防治在農業上的應用漸趨重要，其中生物農藥的發展，已普為社會大眾所肯定並逐步取代化學農藥。根據估計，全世界生物農藥目前產值為二十億美元，未來每年將以 20 % 的速度成長，總計市場需求量可以達到三百億美元。傳統的化學性農藥多年來已造成環境汙染及耐藥性害蟲等問題，以致某些害蟲發生猖獗，造成很大的防治困難及損失。生物農藥之重要特質在其與傳統化學農藥基本作用機制迥異，且在應用上風險（risk）以及負面之影響較低。按此，凡屬自然存在、對特定害物（pests，包括病原、害蟲、雜草等）可產生有害或致死作用，專一性高，對人、畜、作物無毒害作用，及對野生生物與環境沒有藥劑殘留等負面影響之製劑均屬之^(6,9)。生物農藥可與其他生物防

* 通訊作者。E-mail: sskao@tactri.gov.tw

治方法一起使用，進行綜合病蟲害管理系統，不會傷害多數有益的昆蟲和土壤有益微生物。生物農藥大致可分為微生物製劑 (microbial pesticides)、生化製劑 (biochemical pesticides) 及植物生產的製劑 (plant-produced pesticides) 等三類^(6, 23, 30, 34)；其中，微生物製劑包括細菌、真菌、病毒、原生動物、線蟲等之應用，細菌製劑的發展最受到產業界重視，原因在於相關工業化量產所需設備與操控技術均較為成熟，應用性廣泛，效果易於顯現且既有產品最多，尤其是微生物殺蟲劑中的蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 產品，佔整個生物殺蟲劑市場的 90 % 以上。

蘇力菌的殺蟲結晶蛋白 (delta 內毒素) 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。第一個蘇力菌產品於 1938 年在法國製成，但至 1950 年代後期才引起其他多數國家的商業興趣，目前以蘇力菌為基礎的產品超過 100 種⁽²³⁾。全球至今仍持續分離定序出許多的蘇力菌殺蟲基因，並研製重組基因產品。蘇力菌 delta 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 (chimeric) 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^(7, 12, 16, 25, 26)。在過去 50 年，蘇力菌產品大多用於防治鱗翅目某些害蟲，自 1984 年更進入蘇力菌內毒素基因轉殖植物的時代。臺灣亦有研究人員從事蘇力菌殺蟲基因轉殖工作^(1, 5, 14)，但所用之基因大多是國外菌株所帶之基因，於發展上勢必受國外專利限制，因此使用臺灣採獲分離之本土菌株所帶的殺蟲基因進行選殖、定序及表現^(11, 13, 27, 42)，除具本土害蟲與天敵之生態意義外，未來發展出來的產品，在應用上不受國外相關專利限制，將有助於臺灣本土生物技術產業的發展。

蘇力菌殺蟲結晶蛋白基因之分類

各類蘇力菌毒蛋白間之類源關係，因其所含之質體核酸序列 (sequence) 的變異，所產生之殺蟲結晶蛋白不同，殺蟲之對象亦互異^(23, 24, 30, 38)，在國際蘇力菌毒素命名委員會 (*Bacillus thuringiensis* Toxin Nomenclature Committee) 的網站⁽²¹⁾，有關蘇力菌毒蛋白對於鱗翅目、雙翅目、鞘翅目及線蟲之毒性或細胞溶解 (cytolytic) 效果有最新分類與說明。

蘇力菌的鞭毛抗原根據文獻報告有 70 種血清型 (H-serotype) 與 83 個亞種 (serovar)^(23, 33, 34, 43)，其中 *berliner*、*kurstaki*、*aizawai* 菌株可殺死鱗翅目幼蟲，不同亞種可殺死的昆蟲幼蟲也不同。從遺傳基因發現蘇力菌的啟動子 (promoter) 較特殊，若以枯草桿菌的啟動子代替，所製成的蛋白質不具有殺蟲作用。但是利用蘇力菌的載體在枯草桿菌、大腸桿菌、假單胞菌甚至於番茄、煙草等植物上表現，可產生殺蟲效果更高的蛋白質，另外亦可改變蘇力菌的蛋白質分子製造更有效的殺蟲劑。

本土蘇力菌菌株的篩選

臺灣目前蘇力菌市售商品所用菌株皆為國外進口，尚無利用本土蘇力菌菌株

生產之商品。運用蘇力菌毒蛋白或其基因進行生物防治的常見方法之一就是篩選強效的菌種，並將菌體施用於田間；另一種方式是藉由植物基因轉殖 (transgenic) 技術，將毒蛋白基因轉入植物體內，使其在植物細胞內大量表現，以獲致長效性的保護⁽⁴¹⁾。從自然環境中去分離篩選更多殺蟲效力良好、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。本所在過去幾年內，採集篩選得許多殺蟲基因組成與進口蘇力菌不同且其殺蟲活性良好的本土性蘇力菌菌株，有些殺蟲範圍超越傳統市售產品。此策略合乎生態學上，利用本地天敵防治本地害蟲之原則，同時發現新的殺蟲基因亦具學術研究之意義，而利用此自然資源所建立之蘇力菌產品更具經濟之價值。

本所分離篩選含結晶之蘇力菌菌株，係利用熱處理及顯微鏡檢之方法。菌種經活化、培養，抽取純化質體 DNA。再利用下列三類已知基因進行 PCR 鑑定^(10, 19, 20)：Lep+Col+Dip 已知基因引子、*cryI-type* 已知基因引子、*cry2* 已知基因引子。或以特殊引子對蘇力菌核酸進行聚合酵素連鎖反應，產物再以限制酵素剪切，所得之圖譜是為核酸剪切片段多態型 (RFLP)，與已知菌株進行 *cry* 基因鑑定比對，當出現非預定之圖譜時，即可能是新穎基因，此時佐以序列 (sequencing) 分析探究，便可確定發現了新穎基因⁽³¹⁾。

目前本所累計完成並保存上述三類已知基因鑑定與 PCR-RFLP 鑑定總菌株數為 800 株以上^(28, 29)，其中顯示本土蘇力菌之殺蟲結晶蛋白基因之組成複雜且與國外進口之蘇力菌相異，初步預測至少有 29 個疑似新穎的殺蟲結晶蛋白基因⁽¹³⁾，可供進一步定序、確認、改造，供作選殖或轉殖之用。上述菌株或基因，屬於本土性的珍貴自然資源與材料，尤其新穎或有特殊效用的基因可作為未來轉殖基因的來源。

本土蘇力菌基因之選殖和表現

本所近幾年來對於發現之本土蘇力菌株所含疑似新的 *cry* 型基因，正逐一進行定序，以確定其是否為新的 *cry* 型基因，及其分類地位，其中發現新的 *cry* 型基因，且有不同的殺蟲活性及範圍時，可經由基因轉殖的技術，將所選獲的蘇力菌殺蟲基因加以重組、改造，以應付對某些蘇力菌殺蟲基因產物已產生抗性的昆蟲，及增廣殺蟲範圍。

民國 87 年，陽明大學與本所合作，利用已建立之 PCR-RFLP 方法，鑑定新穎 (novel) 殺蟲結晶蛋白基因 (*cry* gene)，已成功自武漢亞種 (*Bt wuhanensis*) 中選殖到 *cry* gene，其 DNA 序列經美國的 *Bacillus* Genetic Stock Center 鑑定確為新穎基因，並分別命名為 *cryIGb1* 和 *cryIBd1*。此二種基因已殖入 *Bt* 選殖體，並轉入 *Bt51* 做基因表現測試。經以三齡之小菜蛾幼蟲為供試昆蟲，測定 *cryIGb1* 和 *cryIBd1* 之基因產物活性時，顯示兩株新穎基因對三齡小菜蛾之毒性較母株武漢亞種為強⁽³²⁾。民國 91 年，中興大學與本所合作，將臺灣本土 *cry1Ac* 基因轉殖成功且證實該轉植株沒有腸毒性 (enterotoxigenicity) 與細胞毒性 (cytotoxicity)⁽⁴²⁾。

另外，本所自行利用 PCR 技術，將蘇力菌臺灣分離株 E9-11 之 *cry1Ac* 基因與 G10-01A 的 *cry1C* 基因分別轉殖成功。E9-11 之 *cry1Ac* 轉植株對小菜蛾幼蟲

效果較遲緩，但後續具有良好的殺蟲活性，處理後 72 小時，死亡率與市售商品對照菌株如 Xentari、Delfin 及同為只含 *cry1Ac* 基因的 HD-73 相仿⁽¹¹⁾。G10-01A 的 *cry1C* 轉植株對小菜蛾有明顯毒效，對擬尺蠖、斜紋夜蛾與甜菜夜蛾則無明顯致死效果，但有抑制取食與使蟲體重量減輕之作用⁽²⁷⁾。91 年已另完成 9 株菌株 *cry1C* 3.5 kb 之複製與純化，並同步進行上述 9 株菌株 *cry1C* 3.5 kb 之核酸解序與片段之序列結果比對工作，完成編號 A6-06x 與 F1-02a 菌株之殺蟲結晶蛋白基因 *cry1C* 3.5 kb 之全部基因定序，並與文獻已知序列進行交叉比對工作，其中 coding region 之 ORF (open reading frame) 全長 3,567 bp 比對結果顯示與 *cry1Ca5* (1996, Strizhov) 各有大於 9 % 與 8 % 的差異，已進行第二次確認比對中。此外，已完成 *cry1C* 基因之中間載體選殖工作，正進行初步的昆蟲幼蟲活性測試。

由於發現來自不同菌種但基因序列完全相同的 *Cry1C* 毒蛋白，殺蟲活性存有極大之差別^(2, 39)，若擬採用 PCR 的快速分子檢定^(15, 35)，建議須同時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，以及該基因亦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基因的基本模式。

蘇力菌基因轉殖微生物

生物基因間的轉移對自然環境的衝擊，以及轉基因食品對人體健康的影響，短期內並無法有具體的科學結論^(8, 23)。於是在現有的侷限性下，有必要另覓開發捷徑，例如運用他種微生物與經濟作物相互的附生關係，進行抗蟲基因的轉形，可擴大蘇力菌毒蛋白基因的應用層面。

目前已有研究將毒蛋白基因轉至螢光假單孢菌 (*Pseudomonas fluorescens*)、氰細菌 (cyanobacteria) 等微生物中，仍能表現出有效的殺蟲蛋白，同時也能長時間留存於自然環境中。本所與中興大學合作，利用葉面拮抗細菌，草生歐文氏菌 (*Erwinia herbicola*) 大量表現蘇力菌殺蟲蛋白基因 *cry1Aa1*，由於表生菌與植物葉面的附著關係，以及轉形質體有逐漸淘汰的特徵^(3, 4)，轉殖過的葉表生菌有潛力成為生物農藥的明日之星，彌補直接施用蘇力菌體保護葉面的不足之處。此外，未來針對不同種類或不同程度的蟲害，尚可另開發其他種類的蘇力菌殺蟲蛋白基因，取代上述試驗中所使用的 *cry1Aa1*，或者將數個基因共同表現於單一草生歐文氏菌的菌體中，以達成生物農藥速效、長效與廣效之理想目標。

蘇力菌基因轉殖植物

蘇力菌結晶毒蛋白具有良好的殺蟲活性，經基因選殖並表現於作物可以保護其不受害蟲攻擊。*Bt* 基因轉殖作物不僅毒效持久，且能達到農藥無法噴灑到的位置。然而，蘇力菌轉基因植物上市仍受到全球農民、農產品業者、決策者和科學家方面的爭議^(8, 40)。國內在馬鈴薯⁽¹⁴⁾、甘藍⁽⁵⁾、青花菜、花椰菜及小白菜⁽¹⁾等多

種轉殖作物上，已有初步成果。中國大陸近年來在農業生物技術之研究發展，亦已應用 DNA 重組技術，將蘇力菌素之基因導入玉米與番茄。

全球從首次證明轉殖蘇力菌結晶蛋白基因可以保護植物免於害蟲的侵入，不到十年光景⁽³⁶⁾，商業化轉殖 *Bt* 棉花和玉米即已大量上市。基因工程作物可減少化學殺蟲劑的使用，對消費者、農夫及環境均有好處。*Bt* 棉花已直接在美國和澳洲栽種，總市場值在 2 億 5 千萬美元，不僅減少殺蟲劑的使用，也提高了 5 % 的收成。全世界每年花費在殺蟲劑約有 81 億美元，有近 27 億被 *Bt* 生物技術之應用所取代。美國曾經至少有 16 個公司參與 *Bt* 基因轉殖作物之開發，於 1996 年美國 *Bt* 轉基因作物成長超過 300 萬英畝，其中包括孟山都轉基因棉花 10 萬英畝，1997 年所有轉基因作物之栽種已超過 2,000 萬英畝⁽³⁷⁾。目前 *Bt* 轉殖棉花在美國能防治棉花上的兩種主要害蟲，但仍受棉鈴蟲 (*Heliothis virescens*) 攻擊，顯示此害蟲對 *Bt* 轉殖棉花有抗性。許多研究人員亦陸續發表有關害蟲抗性發生頻率的報導，不過害蟲發生的抗性在有效的管理下可能在十年甚至二十年後才會顯現，比起施用化學農藥引發的抗性仍算微小。

蘇力菌面臨問題與未來展望

以蘇力菌為基礎的產品大多是在生長成熟穩定期所釋出的孢子和結晶包涵體所配製而成，蘇力菌毒素的分子力價較其他殺蟲劑高很多（比有機磷高 80,000 倍）⁽²²⁾。*Bt* 菌用於噴灑在葉面已有數十年之久，但僅限於有機農業和加拿大森林，占整個殺蟲劑市場不到 1 %。其中 60 % 的蘇力菌是應用在森林，而農業和公共衛生方面的使用只佔 18 %⁽¹⁸⁾。大多數的蘇力菌產品是用來控制蛾類吃葉子，較新的產品也有用來防治其他的昆蟲。蘇力菌產品必須排除下列幾項障礙後，才可能達成預期的目標。首先，蘇力菌的使用受限於活性範圍狹窄，產品效價變化大，且成本昂貴等缺點。一般而言，蘇力菌產品價格約是傳統合成化學藥品的五倍。Ecogen 和 Mycogen 在改良蘇力菌菌種方面居於領導的地位，問世的產品為所謂的第一代產品。第二代產品是經由新的基因重組如嵌合基因 (chimeric gene) 和突變而來，至今尚未製造生產。蘇力菌另外的缺點是 delta 內毒素施灑於葉面會在兩天內分解，若將蘇力菌的 delta 內毒素基因轉移至其他微生物或植物，也許可改善這些殺蟲蛋白的輸送、效力、持效性或甚至宿主範圍。值得一提的是，蘇力菌產品有多種不同的蘇力菌毒素供選擇利用，農夫可以交替使用以減少對蘇力菌有抗性的害蟲產生。

至於轉殖技術雖已成功地應用於商業化植物品種，但某些作物較易於轉殖，某些作物則相當困難，而且結晶蛋白雖具備有價值的殺蟲譜，仍需要針對其他目標更為廣泛的蛋白基因來進行轉殖，並要發展殺蟲抗性之管理策略才可以將 *Bt* 基因作物發揮至更多的品種。其中並要建立強勢的策略以保障智慧財產權，包括植物轉殖、選擇性標記、啟動子、*Bt* 結晶蛋白、基因表現技術和抗性管理的專利申請等。目前已有 170 個以上的蘇力菌結晶蛋白序列被定出⁽²¹⁾，每一個結晶蛋白均有其特定的殺蟲特性，Cry 1 Ab 蛋白對歐洲玉米螟活性強，Cry 1 Ac 蛋白對菸芽夜蛾 (*Heliothis virescens*) 和棉鈴蟲具有較強的殺蟲活性，Cry 3A 蛋白則是用

來保護科羅拉多馬鈴薯甲蟲。此外，其他細菌例如，雙酵素梭菌 (*Clostridium bifermentans*) 和圓形芽孢桿菌 (*Bacillus sphaericus*) 亦可以產生殺蟲蛋白。未來基因轉殖作物的開發仍需要依賴栽種者、食品加工業者，和消費者的接受度來開拓市場，生技、種籽和農藥工業亦必須與生產者合力工作整合新技術至目前耕種操作系統，以推動更多的轉殖作物。

結 語

由於化學農藥不僅對土壤、作物、人、畜造成毒害，更污染了河流和整個環境，生物農藥未來發展的空間和潛力相當大。由於世界對生物防治的需求不斷的增加，加上研究人員持續改進傳統蘇力菌產品不安定的特性，以及開發新菌種擴大防治範圍等因素，使得蘇力菌產品的潛力大大的增加。

以蘇力菌為主的生物殺蟲劑在 1990 年至 1992 年，三年銷售量增加了 80 %。蘇力菌產品成為生物農藥銷售的最大宗，可歸因於配方和製造方面的改善，使得產品更為有效，尤其成本降低，某些甚至可與化學藥劑相比⁽¹⁷⁾。另外的因素尚包括生物技術的應用，對蘇力菌產品作用模式的瞭解。近年來，蘇力菌株已被發現對線蟲及動物寄生蟲具有抑制活性，蘇力菌產品也由鱗翅目（小菜蛾），雙翅目（蚊和蚋），和鞘翅目（甲蟲）逐漸擴大其目標害蟲範圍，同時擴展蘇力菌應用在農業的市場範圍^(22, 30)。此外，過去 10 年仍有許多產品問世，使得生物殺蟲劑市場欣欣向榮。生物技術和重組技術已用來增進殺蟲活性和產品配方，如 Ecogen 公司的 Condor、Cutlass、Foil，以及 Mycogen 的 MVP 與 M-Trak^(17, 34)。

本所目前仍持續開發本土性蘇力菌，提供含不同基因且殺蟲效果良好之替代蘇力菌，期能儘速商品化，減少國內產業對進口之依賴。同時協助農民控制本省主要作物害蟲，減少傳統農藥的使用，保護生態系統，提出因應未來傳統藥劑或蘇力菌抗藥性產生問題之解決方案，更期能為厚植我國之生物技術產業提供相關經驗與可用資源。

引用文獻

1. 尤進欽、曾夢蛟、陳良築。1996。蘇力菌殺蟲晶體蛋白基因轉移到青花菜、花椰菜及小白菜。中國園藝 42：312-330。
2. 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。
3. 林志輝、黃文忠、曾經洲、陳良築。2002。含蘇力菌毒素基因 *cry1Aa1* 之轉形葉表生菌 *Erwinia herbicola* 的殺蟲活性與質體留存之分析。植保會刊 44：21-36。
4. 林志輝、曾經洲、高穗生、陳良築。2003。含蘇力菌毒素基因 *cry1Aa1* 之轉形葉表生菌 *Erwinia herbicola* 的殺蟲效力與拮抗植物病原菌之分析。中華農學會報 4：17-29。
5. 張隆武、曾夢蛟。1997。蘇力菌殺蟲晶體蛋白基因轉移至甘藍之研究。興大園

藝 22：61-73。

6. 高穗生。2000。生物殺蟲劑簡介。第一章，農村青年中短期農業專業訓練教材。行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所技術服務室編印。臺中。
7. 高穗生、曾經洲。1998。利用生物技術來改善蘇力菌殺蟲結晶蛋白。台灣省農業藥物毒物試驗所技術專刊 79：1-8。
8. 黃三光、曾經洲。2001。基因改造作物的優勢與潛藏的危機。行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所技術專刊 110：1-11。
9. 曾經洲。2001。蘇力菌在整合蟲害管理上之應用。第 313-328 頁。謝豐國、林政行、顧世紅編。跨世紀台灣昆蟲學研究之進展研討會專刊。國立自然科學博物館刊印。
10. 曾經洲。2001。蘇力菌菌種鑑別試驗檢驗方法。行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所技術專刊 101：1-10。
11. 曾經洲、高穗生、陳良築、翟建富、侯豐男。2002。蘇力菌臺灣分離株 *cry1Ac* 基因之選殖及表現測試。植保會刊 44：185-208。
12. 曾經洲。1998。蘇力菌與其應用現況。臺灣省農業藥物毒物試驗所技術專刊 77：1-11。
13. 曾經洲。1997。蘇力菌臺灣分離株殺蟲基因之鑑定及選殖。國立中興大學昆蟲學系博士論文。臺中。141 頁。
14. 詹明才、陳良築、張新雄。1996。蘇力菌殺蟲晶體蛋白基因在轉殖馬鈴薯的表現。中央研究院植物學彙刊 37：17-23。
15. 謝奉家、高穗生。2000。聚合酵素連鎖反應（PCR）在農業生物技術上之應用簡介。行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所技術專刊 96：7-12。
16. Adang, M. J., Staver, M. J., Rocheleau, T. A., Leighton, J., Barker, R. F., and Thompson, D. V. 1985. Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*. *Gene* 36: 289-300.
17. Anonymous. 1992. Steep sales rise for Bt-based bioinsecticides. *Biotechnol. Business news*. 11, Dec: 12-14.
18. Anonymous. 1991. Several hurdles remain for bacterial insecticides. *Biotechnol. Business news*. Aug.: 8-10.
19. Bruce, K. D., Hiorns, W. D., Hobman, J. L., Osborn, A. M., Strike, P., and Ritchie, D. A. 1992. Amplification of DNA from native population of soil bacteria by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3413-3416.
20. Carozzi, N. B., Kramer, V. C., Warren, G. W., Evola, S., and Koziel, M. G. 1991. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3057-3061.
21. Crickmore, N., Zeigler, D. R., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Bravo, A., and Dean, D. H. 2003. "Bacillus thuringiensis toxin nomenclature" http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/ (date site accessed)
22. Feitelson, J. S., Payne, J., and Kim, L. 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and

- beyond. Bio/Technology. Mar: 271-275.
23. Glare, T. R., and O'Callaghan, M. 2000. *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. John Wiley & Sons, West Sussex, UK. 350 pp.
 24. Hofte, H., and Whiteley, H. R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53: 242-255.
 25. Kalmam, S., Kiehne, K., Libs, J. L., and Yamamoto, T. 1993. Cloning of a novel *cryIC*-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*. Appl. Environ. Microbiol. 59: 1131-1137.
 26. Kalmam, S., Kiehne, K., Libs, J. L., Cooper, N., Reynoso, M. S., and Yamamoto, T. 1995. Enhanced production of insecticidal proteins in *Bacillus thuringiensis* strains carrying an additional crystal protein gene in their chromosomes. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3063-3068.
 27. Kao, S. S., Hsieh, F. C., Tzeng, C. C., and Tsai, Y. S. 2003. Cloning and Expression of the Insecticidal Crystal Protein Gene *CryICa9* of *Bacillus thuringiensis* G10-01A from Taiwan Granaries. Current Microbiol. (in press)
 28. Kao, S. S., Tzeng, C. C., and Tsai, Y. S. 1997. Identification of possibly novel *cry*-type genes of *Bacillus thuringiensis* isolates from Taiwan by RFLP of the PCR-amplified DNA. The 3rd Asia-Pacific conference of entomology. Nov. 16-22. Taichung, Taiwan, ROC, p103.
 29. Kao, S. S., Tzeng, C. C., Tuan, S. J., and Tsai, Y. S. 1996. Isolation, characterization and *cry* gene typing of *Bacillus thuringiensis* from stored product material samples collected around Taiwan. The 2nd Pacific rim conference on biotechnology of *Bacillus thuringiensis* and its impact to the environment. Nov. 4-8. Chiang Mai, Thailand, pp. 132-151.
 30. Khetan, S. K. 2001. Microbial pest control, Marcel Dekker, New York, USA. 300 pp.
 31. Kuo, W. S., and Chak, K. F. 1996. Identification of novel *cry*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains on the basis of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified DNA. Appl. Environ. Microbiol. 6: 1369-1377.
 32. Kuo, W. S., Lin, J. H., Tzeng, C. C., Kao, S. S., and Chak, K. F. 2000. Cloning of two new *cry* genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *wuhanensis* strain. Current Microbiol. 40: 227-232.
 33. Lecadet, M. M., Frachon, E., Dumanoir, V. C., Ripouteau, H., Hamon, S., Laurent, P., and Thiery, I. 1999. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. J. Appl. Microbiol. 86: 660-672.
 34. Matten, S. R., Milewski, E. A., Schneider, W. R., Slutsky, B. I. 1993. Biological pesticides and the U.S. environmental protection agency, pp. 321-335. In: L. Kim ed. Advanced engineered pesticides. Marcel Dekker, New York, USA. 430 pp.
 35. McPherson, M. J., Quirke, P., and Taylor, G. R. 1991. PCR A Practical Approach.

- 253pp. Oxford University Press, New York.
36. Peferoen, M. 1997. Progress and prospects for field use of Bt genes in crops. *Trends in Biotechnol.* 15:173-177.
37. Roush, R. T., and Shelton, A. M. 1997. Assessing the odds: the emergence of resistance to Bt transgenic plants. *Natural Biotechnol.* 15: 816-817.
38. Rowe, G. E., and Margaritis, A. 1987. Bioprocess developments in the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. *CRC Critical Rev. Biotechnol.* 6: 87-127.
39. 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: 68-684.
40. Van Rie, J. 2000. *Bacillus thuringiensis* and its use in transgenic insect control technologies. *Int. J. Med. Microbiol.* 290: 463-469.
41. Vaeck, M., Reynaerts, A., Hofte, H., Fansens, S., Beukeleer, M. D., Dean, C., Zebeau, M., Montagu, M. V., and Leemans, J. 1987. Transgenic plant protected from insect attack. *Nature* 328: 33-37.
42. Yang, C. Y., Pang, J. C., Kao, S. S., and Tsen, H. Y. 2003. Enterotoxigenicity and cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* strains and development of a process for Cry1Ac production. *J. Agric. Food Chem.* 51: 100-105.
43. Yu, Z., Sun, M., and Liu, Z. 1999. The research and application of *Bacillus thuringiensis* biotechnology in China, pp. 6-14. *In*: Z. Yu, M. Sun, and Z. Liu [eds.], *Biotechnology of Bacillus thuringiensis*, the 3rd Pacific Rim Conference on Biotechnology of *Bacillus thuringiensis*, October 5-9, 1999, Wuhan, China.

ABSTRACT

Kao, S. S.* and Hsieh, F. C. 2003. Cloning and application of local *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein genes. Plant Prot. Bull. Spec. Publ. New 5 (Proceedings of the Workshop on Plant Protection Management for Sustainable Development: Technology and New Dimension): 249 – 258. (Department of Biopesticide, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture, Taichung 413, Taiwan, ROC)

Bacillus thuringiensis (*Bt*) has been used for over 50 years, since the launch of the first product in France in 1938, in agriculture and forestry with almost no reported adverse effects. The efficacy and specificity of *Bt* strains and individual toxins produced by *Bt* isolates are such that a large number of insecticidal products are based on this bacterium and/or its toxins. Over 100 *Bt*-based products have been produced around the world, and *Bt* products currently constitute over 90 % of all biopesticides sold. The insecticidal activity of *Bt* is related mainly to the range of insecticidal δ -endotoxins produced by each isolate. It has been regarded as a biopesticide with toxicity limited to a few lepidopterans, dipterans, and coleopterans. However, the use of *Bt* toxins are rapidly increasing with expression of the *Bt* gene in other organisms, including bacteria and plants; moreover, novel *Bt* isolates active against an increasingly wider range of organisms, for example nematodes, are being discovered. At present, over 170 distinct δ -endotoxin genes, mainly encoding insecticidal proteins, have been described, and the discovery of new toxins is increasing as new *Bt* strains are isolated. In this article, we review the classification of *Bt* strains, the screening of the local *Bt* strains in Taiwan, the cloning and expression of novel *cry* genes found in Taiwan, and the rapid advances in transgenics. As it is difficult to access all publications and reports, there will undoubtedly be a number of omissions, despite our best intentions.

(Key words: *Bacillus thuringiensis*, insecticidal crystal protein, cloning, expression)

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