

出國報告（出國類別：其他，國際會議）

參加「第 41 屆無脊椎病理學會年會暨第 9 屆蘇力菌國際會議」（The 41st Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology and the 9th International Conference on *Bacillus thuringiensis*）
會議報告

服務機關：行政院農委會農業藥物毒物試驗所

姓名職稱：高穗生 研究員、謝奉家 助理研究員

派赴國家：英國

出國期間：97 年 8 月 3 日至 97 年 8 月 7 日

報告日期：97 年 10 月 20 日

公務出國報告摘要

頁數：13 含附件：無

報告名稱：參加「第 41 屆無脊椎病理學會年會暨第 9 屆蘇力菌國際會議」報告

主辦機關：行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所

聯絡人/電話：高穗生/04-23302101#801；謝奉家/04-23302101#813

出國人員：高穗生 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所 研究員

謝奉家 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所 助理研究員

出國類別：其他（國際會議）

出國地區：英國

出國期間：97 年 8 月 3 日至 96 年 8 月 7 日

報告日期：97 年 10 月 20 日

分類號／目：

關 鍵 詞：光桿菌，蘇力菌，枯草桿菌，微生物防治

內容摘要：本次研討會在 97 年 8 月 3 日至 7 日假英國考文垂市的 Warwick 大學舉行，共有細菌、真菌、病毒、線蟲、微孢子蟲、微生物防治等 6 個討論主題和 1 個特別專題演講，以口頭論文及壁報論文兩種型態進行。有 40 個國家，約 400 人與會，共有 233 篇口頭論文報告和 148 篇壁報展示，本所發表口頭論文一篇「本土光桿菌 0805-P5G 鹼性金屬蛋白質分解酵素的生化特性分析和殺蟲活性」（附錄一）與海報論文一篇「黏質沙雷氏菌 ATCC990 幾丁質分解酵素 *chiA* 基因轉殖至枯草桿菌與蘇力菌宿主間的抑菌活性表現之比較」（附錄二）。研討會內容豐富多樣，除了微生物製劑之討論外，在綜合防治上著墨亦相當多。會中及參訪過程對諸多議題均有深入之探討，並與大會之其他人員交換意見，吸收知識。對台灣本土生物農藥之研發應用有許多新的啟發，對爾後的學術交流，亦奠定良好的基礎。本報告提出 5 點建議事項。

目 錄

壹、目的.....	3
貳、行程.....	4
參、心得.....	5-8
肆、建議.....	8-9
附錄一、「本土光桿菌 0805-P5G 鹼性金屬蛋白質分解酵素的生化特性分析和殺蟲活性」口頭論文中文摘要.....	10
附錄二、「黏質沙雷氏菌 ATCC990 幾丁質分解酵素 <i>chiA</i> 基因轉殖至枯草桿菌與蘇力菌宿主間的抑菌活性表現之比較」海報論文中文摘要.....	11
附錄三、會議相關照片.....	12-13

壹、 目的

農委會藥毒所的研究團隊，多年來對於蘇力菌、枯草桿菌與光桿菌皆有深入研究，尤其篩獲具開發潛力的本土菌株，其生物活性經評估證實對本土之害蟲和植物病原菌，均有相當高的殺蟲和拮抗作用。本次參與國際會議目的就是希望瞭解世界各國在細菌類殺蟲劑、殺菌劑與其它微生物農藥領域上的最新進展並分享台灣的最新發現成果。在本次大會中提出口頭論文一篇「本土光桿菌 0805-P5G 鹼性金屬蛋白質分解酵素的生化特性分析和殺蟲活性 (Biochemical characterization and insecticidal activity of an alkaline metalloprotease produced by *Photobacterium luminescens* 0805-P5G isolated from Taiwan)」與海報論文一篇「黏質沙雷氏菌 ATCC990 幾丁質分解酵素 *chiA* 基因轉殖至枯草桿菌與蘇力菌宿主間的抑菌活性表現之比較 (Comparison of phytopathogenic antagonism between *Bacillus subtilis* and *Bacillus thuringiensis* strains transformed with *chiA* gene from *Serratia marcescens* ATCC990)」，並與大會之其他人員交換意見，吸收知識。本次參加會議承國科會補助高穗生研究員與謝奉家助理研究員部份經費 (NSC 97-2317-B-225-001)，謹此申謝。其餘經費自籌。

貳、行程

8月2日(六)	台北→倫敦→考文垂市	去程
8月3日(日) 至 8月7日(四)	考文垂市	<p>1.註冊、開幕式。</p> <p>2.邀請講演、口頭論文報告、壁報論文展示。</p> <p>8月5日 10:30-12:30 和8月6日 16:30-18:30進行壁報論文展示與討論，內容包括：細菌類52篇、微生物防治21篇、病毒類37篇、真菌類28篇、線蟲類4篇、微孢子蟲3篇、其它3篇。</p> <p>3.發表研究成果報告</p> <p>4.整理資料。</p>
8月8日(五)	英國的考文垂市→倫敦	參觀與學術文化交流。
8月9日(六) 至 8月11日(一)	倫敦→台北	回程※

※ 8月2日至8月9日辦理公假出國開會，8月11日請國外休假（8月10日為星期日）。

參、心得

無脊椎動物病理學會 (Society of Invertebrate Pathology, SIP) 創立於 1967 年，匯集不同背景但同樣從事無脊椎動物病理研究的人員進行討論及訊息交換，每年在 8 月期間舉辦年會，包含研討會與論文宣讀等。今年為第 41 屆無脊椎病理學會年會暨第 9 屆蘇力菌國際會議 (The 41st Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology and the 9th International Conference on *Bacillus thuringiensis*)，會議在英國考文垂市的 Warwick 大學 (University of Warwick, Coventry, United Kingdom) 舉行。此次奉派參加，可經由演講與海報展示，認識許多國家的研究人員，進行學術交流。根據大會統計這次超過 40 個國家與 400 人以上參加。台灣共有 18 人參加，包含中央研究院、台灣大學、農委會藥毒所與大葉大學。本所有 1 篇口頭論文報告與 1 篇海報論文展示。此次會議主辦單位提供學校的住宿大樓作為住宿區，相當方便，但英國物價高，所以開銷並不便宜。由於會議的場所與住宿皆在校園中，會議的行程安排頗為緊湊，自早上 8 點至晚上 10 點皆有會議或研討會進行，會議採取不同主題同時進行，尤其晚餐時間後也安排小型互動研討會。僅有週二中午以後的半天，安排參訪古堡與莎士比亞出生地，週四傍晚大會會議全部結束後，參加歡送晚宴。

會議的進行分成數個主題，包含細菌、真菌、病毒、線蟲、微孢子蟲、微生物防治與相關交叉領域等 7 個討論主題，上述主題涵蓋無脊椎動物的病原，其中，蘇力菌、線蟲共生細菌、蟲生真菌與桿狀病毒的主題更是農委會藥毒所生物藥劑組目前的主要研究項目。在同時間不同會場內進行不同主題的會議，雖然立意很好，但因為各主題之間的研究方式常是相關或相似，造成選擇聽講場次上，有魚與熊掌不可兼得的狀況。但我方人員仍積極記錄與蒐集相關資訊，期能發揮最大效益。茲列舉相關事項如下：

一、微生物製劑之研發、品管和註冊登記：

理論上微生物防治策略能提供植物保護最永續和生態能接受的方法，研究工作時常承諾能對最難纏的病蟲害有最好的解決方案。但是這種潛力絕少在運作和商業層次獲致成功。應該試圖去除在開發一可信賴、有效且能上市產品的一切路障。我們應該多在產品傳輸 (delivery) 這方面多努力，而非僅在發現 (discovery) 這端投入。此外，應對微生物生態 (microbial ecology) 加強研究。如果我們探討過去如何

成功，瞭解為何失敗，瞭解市場和管理環境的需求，調查何種工具、技術和資源的投入有助於微生物的有效使用，我們就有能力發展一套更合理更成功的微生物製劑商品的成功之道。

蘇力菌產品效果穩定和安全有助於提升消費者信心，從而增進對蘇力菌和其他微生物製劑使用量和需求。一個公司蘇力菌產品的品管不佳可能危及市場對蘇力菌和微生物製劑的信心。利用可靠的標準確保其生物活性固然重要，但是只不過是品管的一環。事實上品質管制，在所有生產階段均需要注意，包括從菌種鑑定到包裝及銷售的整個過程。除了實施高標準的品質管制外，對所有在市場的微生物製劑，整個生物農藥工業界均應該提供嚴格的監管（stewardship）。

微生物製劑在歐洲之註冊登記提供的安全評估資料，大部份是依申請如化學農藥的方式行之。歐盟在 2006 年依 Policy Support Action REBECA 法案進行對微生物製劑潛在風險的評估，提出一更為平衡的規範草案。草案中亦論及蟲生病原線蟲，一般而言，是朝簡化資料的方式進行。

二、害蟲微生物防治：

由於微生物製劑具選擇性和安全性，成為有害生物綜合管理（integrated management, IPM）系統裏現成成分，不會構成農民和環境的威脅，使得天敵能仍然發揮其功能。利用病毒、蘇力菌和蟲生病原線蟲來防治蘋果、梨、核果、柑桔和數種堅果均有良好的結果。蘇力菌用來防治果園裏之鱗翅類害蟲。利用蟲生病原線蟲防治象鼻蟲亦有顯著之成效。施用蘋果蠹蛾顆粒病毒來防治蘋果和梨之蘋果蠹蛾不只有機農民之使用量增加，就是一般農民也顯示高度的興趣。針對在特定棲所的害蟲要選擇最有效的微生物製劑時，要對害蟲和病原菌及果園的生態系統有充分的瞭解，始能奏功。如果選定了此有效的微生物製劑，則可經由適當的配方和適時的施用來強其活性，達到最大的效果。Pell 更提出保育型之生物防治（conservation biological control, CSC）之觀念，認為可以改變環境或原有的措施，來保護或強化天敵，以減少害蟲的影響。在蟲生真菌之應用上有相當的意義存在。

三、光桿菌生物膜形成和異小桿線蟲定殖之關係：

光桿菌（*Photorhabdus*）是蟲生病原性，革蘭氏陰性能活動的細菌屬於腸內細菌科（Enterobacteriaceae），和異小桿線蟲（*Heterorhabditis*）形成一種特殊的互利共生關係。光桿菌異生活史複雜，但能和異小桿線蟲持續成功的互利共生，要靠線蟲之

具感染性幼蟲(infective junvile, IJ)能夠在害蟲體內定殖與否。實驗證實光桿菌能在具感染性幼蟲之腸道內形成生物膜 (biofilm)，而生物膜的形成則和線蟲在害蟲體內定殖與否有密切關係。

四、開發蟲生病原線蟲之控制釋放系統：

應用方法是決定蕪菁夜蛾線蟲 (*Steinernema feltiae*) 防治油菜害蟲時，防治效果和持效性的一個重要條件。開發一個控制釋放系統 (controlled release system, CRS)，有助於延遲在施用後蟲生病原線蟲之出現，而讓線蟲能逐步出現。如此農民可於適當時期提早施用，保護線蟲不受拮抗生物之影響，降低施用之劑量和水量。實驗室證實自控制釋放系統出現的線蟲能延遲 15 天，並逐步出現，在土壤中 35 天仍能保持其感染性。田間試驗顯示控制釋放系統較噴施有較佳的防治效果和持效性。

五、蜂群崩潰疾病 (Colony Collapse Disorder, CCD)：

蜂群崩潰疾病 2006 年末被發現，其病徵從未見過。蜜蜂在短時間內迅速崩潰，外勤蜂失蹤，受害蜂巢未見斃亡之蜜蜂，新羽化之工蜂和蜂雛減少。據 Cox-Foster 利用後基因體學分析 (metagenomic analysis) 鑑定有 4 種病原菌與蜂群崩潰疾病有密切關係。這 4 種病原菌為以色列急性麻痺病毒 (Israeli Acute Paralysis virus, IAPV)、喀什爾蜂病毒 (Kashmir Bee Virus)、蜜蜂微粒子蟲 (*Nosema apis*) 和中華蜜蜂微粒子蟲 (*N. ceranae*)。Sela *et al.* 證實 IAPV 的基因體片斷會被併入蜜蜂之基因體內，而具有經整合之 IAPV 序列之蜜蜂，則對 IAPV 有抗性。此種整合導致蜜蜂行為的改變，致使蜜蜂造成蜂群崩潰疾病的發生。

六、耶爾森氏菌新菌株 EN65 可作為小菜蛾防治的新殺蟲劑：

實驗室證實，不能形成孢子的耶爾森氏菌新菌株 EN65 對有些鞘翅目和鱗翅目害蟲包括小菜蛾具有活性。在噴灑此菌到小菜蛾為害之葉片，有很好的防治效果與蘇力菌的大寶 (Dipel) 相當，較賜諾殺 (Spinosad) 略遜一籌。當以凝膠劑型施用時，較以發酵液噴灑時，在葉面附著和持效性為高。此菌尚能在小菜蛾屍體內繁殖，可作為其他幼蟲的感染源。

七、側孢短芽孢桿菌對家蠅防治之潛力和對蛹寄生蜂非洲角蠅金小蜂之安全性：

實驗室之觀察證實側孢短芽孢桿菌 (*Brevibacillus laterosporus*) 對家蠅病原活性為毒素媒介的過程 (toxin-mediated process)。主要蛋白質大約 14kDa，可自獨木舟狀之側孢體 (parasporal body) 萃取出來，與觀察到之毒性有關。高劑量時對家蠅之蛹寄

生蜂非洲角蠅黃金小蜂 (*Mucidifurax raptor*) 僅有少許作用。顯示以側孢短芽孢桿菌搭配寄生蜂進行家蠅整合性管理之策略可行性甚高。

八、兼具病蟲害防治的蘇力菌：

蘇力菌 519-1 菌株對八種真菌包括黑麴黴菌 (*Aspergillus niger*)、蝴蝶蘭灰黴菌 (*Botrytis cinerea*)、禾本科镰孢菌 (*Fusarium graminearum*)、產黃青黴菌(*Penicillium chrysogenum*)、梨生囊孢殼菌 (*Physalospora piricola*)、立枯絲核菌 (*Rhizoctonia solani*)、黑根黴菌 (*Rhizopus nigricans*) 之菌絲生長有拮抗性 (antagonistic activity)。能夠抑制孢子囊 (Sporangia) 之發芽。培養液對玉米穗蟲 (*Helicoverpa amigera*) 和甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) 具高毒性。PCR 分析顯示該菌株含有 *cry1Aa*、*cry1Ab*、*cry1Ac*、*cry2* 和 *cry1I* 及 *vip3A*。結晶蛋白經 SDS-PAGE 分析其分子量為 130, 80, 75, 65 和 60kDa。此菌株對植物病原真菌有廣泛的拮抗性，對鱗翅目類害蟲有高殺蟲毒性。

全球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。本次會議的另一重頭戲應屬第 9 屆蘇力菌國際會議的召開。農委會農業藥物毒物試驗所這二年也有國內菌株技轉成功的案例，例如，採自花蓮某農會穀倉的「蘇力菌 (E9-11)」已技轉給福壽公司並製成台灣第一個「本土蘇力菌生物殺蟲劑」，對葉菜類生長時最多的蛾蝶類害蟲相當有效。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，若所用之基因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，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。另外，在此次會場上也難得可以親自聆聽到許多國際知名學者的現場精彩提問，令人印象深刻。

此次會議流程從開始至結束十分順利，在海報討論時段與相近主題或是對我方主題有興趣的研究人員進行交流，並能獲得聯絡方式，方便後續的通訊交流。會後，帶回許多研究方法與初步成果作為本所相關研究人員參考。

肆、建議

- 一、微生物製劑效果和應用之提升，可經由開發新品系、經由分子生物學或非分子生物學的方法改善既有的品系、改善施用方法和經由製劑配方來改善在環境中之持效等方式來達成。利用環境之操縱來改善微生物製劑之活性和持效性已有成效，未來應進行更深入之調查。經由微生物生態學、流行疫病學、有害生物之病原菌之棲群動態學的基礎研究和對寄主-病原菌關係之研究，可使微生物防治更臻理想。
- 二、加強國內對蜜蜂崩潰疾病（CCD）之研究，有助於對該疾病的瞭解，從而提出解決之方案，以消除該疾病對國內蜂群造成之衝擊，減少蜂農的損失，提升水果的結實率和產量。
- 三、微生物製劑產品之開發應在產品傳輸（delivery）端多努力，而非僅著重在發現（discovery）這方面的投入。同時要加強微生物生態學之研究，瞭解市場和管理環境之需求，重視每個階段的品質管制和上市後之監管。此外，任何加強推廣教育之實施，均有助於微生物製劑之有效使用。另外，簡化註冊登記的流程和資料之需求，更能加速微生物製劑的上市。
- 四、新穎微生物製劑之開發包括新作用機制之品系之發現和新製劑配方技術之提升、兼具病蟲害防治微生物測試，均在未來微生物製劑之研發進程上，扮演重要的角色。
- 五、台灣參加本次會議的人數，仍遠低於日本與中國大陸，期待國內研究主管機關擴大補助參加國際會議的相關額度，不但可以增進國內研究人員的外語能力，亦有助於提升台灣微生物農藥在此領域的研究深度以及國際知名度。最重要的是刺激研究人員產生更優異的成果發表在國際知名期刊，藉以建立本土特色以及領導地區性的研究領域，甚至進行國際合作計畫。

附錄一、「本土光桿菌 0805-P5G 鹼性金屬蛋白質分解酵素的生化特性分析和殺蟲活性」口頭論文中文摘要

本土光桿菌 0805-P5G 鹼性金屬蛋白質分解酵素的生化特性分析和殺蟲活性

謝奉家、張佑慈、高穗生*

行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所 生物藥劑組

蛋白質分解酵素在病原與宿主之間扮演重要角色，本研究利用光桿菌菌株對脫脂奶粉與明膠平板之蛋白質水解能力，自 13 株供試之本土菌株中，篩選 4 株活性較佳之菌株，進一步培養於 NB、LB 和 PP3T 等不同的液態培養基，測試蛋白質分解酵素之活性。初步實驗結果顯示，光桿菌菌株 0805-P5G 的蛋白質分解酵素於 NB 液態培養液，在培養八天後其活性較佳。光桿菌的蛋白質分解酵素利用 FPLC 進行 DEAE sepharose column 及 Q sepharose column 等連續步驟純化，可使蛋白質分解酵素純度提高。接著利用膠體酵素活性電泳分析(zymogram)得到 0805-P5G 菌株的蛋白質分解酵素，以聚丙烯醯胺凝膠電泳(SDS-PAGE)確認其分子量，其蛋白質活性位置大約為 54 kDa，並進行 N 端與 LC MS/MS 定序確認其為光桿菌蛋白質分解酵素。利用 FPLC 獲得純化的蛋白質分解酵素，測試結果顯示上述酵素活性最適溫度為 60°C、最適酸鹼值為 pH 8。此蛋白質分解酵素會受金屬螯合劑 EDTA 及 1, 10-phenanthroline 之抑制，證實其為金屬蛋白質分解酵素。光桿菌蛋白質分解酵素經注射大蠟蛾處理後，發現具有殺蟲效果；光桿菌蛋白質分解酵素經餵食處理後，其對本土小菜蛾有口服殺蟲效果，但對美國品系的小菜蛾口服殺蟲效果較差。

通訊作者 sskao@tactri.gov.tw

附錄二、「黏質沙雷氏菌ATCC990幾丁質分解酵素*chiA*基因轉殖至枯草桿菌與蘇力菌宿主間的抑菌活性表現之比較」海報論文中文摘要

黏質沙雷氏菌 ATCC990 幾丁質分解酵素 *chiA* 基因轉殖至枯草桿菌與蘇力菌宿主間的抑菌活性表現之比較

謝奉家*、曾瑞堂、高穗生

行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所 生物藥劑組

某些細菌產生之幾丁質分解酵素與其對植物病原菌之拮抗活性有關。黏質沙雷氏菌，為革蘭氏陰性菌，能有效降解幾丁質，其幾丁質分解酵素基因 *chiA* 最廣為人知。本研究係將黏質沙雷氏菌 ATCC990 的幾丁質分解酵素 *chiA* 基因分別轉殖至原本不能產生幾丁質分解酵素的枯草桿菌 (*B. subtilis* S3) 與能生產幾丁質分解酵素的蘇力菌 (*B. thuringiensis cry⁻B*)，並選用同樣基因轉殖至枯草桿菌 ISW1214 的轉殖株供試，藉以比較含 *chiA* 基因之不同轉殖株，其表現幾丁質分解酵素對抗菌效果之影響。轉殖株以 LB 液體培養基進行培養，測定幾丁質分解酵素的活性。結果顯示，枯草桿菌 S3 及蘇力菌 *cry⁻B* 為宿主的轉殖株 (TBs.S3 及 TBt.*cry⁻B*)，其酵素活性皆高於枯草桿菌 ISW1214 之轉殖株 (TBs.1214)，以所有轉殖株酵素活性最高的第六天數據為例，前兩者酵素活性約可高出後者 1.5-1.7 倍，轉殖株對分解含有 1% 膠態幾丁質平板的速度亦不同，TBs.S3 及 TBt.*cry⁻B* 較 TBs.1214 約可提早 12-15 天。將轉殖株不含菌體之上清液與 16 株植物病原真菌進行對峙試驗，結果顯示，對某些病原菌確實具有抑菌活性，且 TBs.S3 的抑菌效力較優於 TBt.*cry⁻B* 與 TBs.1214。TBs.S3 對百合白絹病菌 (*Sclerotium rolfii* Saccardo) 與薑軟腐病菌 (*Pythium myriotylum* Drechsler) 的抑菌效力確實高於枯草桿菌 S3 宿主；而 TBt.*cry⁻B*，其對於薑軟腐病菌的抑菌效力亦高於蘇力菌 *cry⁻B* 宿主。

通訊作者 hsiehf@tactri.gov.tw

附錄三、會議照片



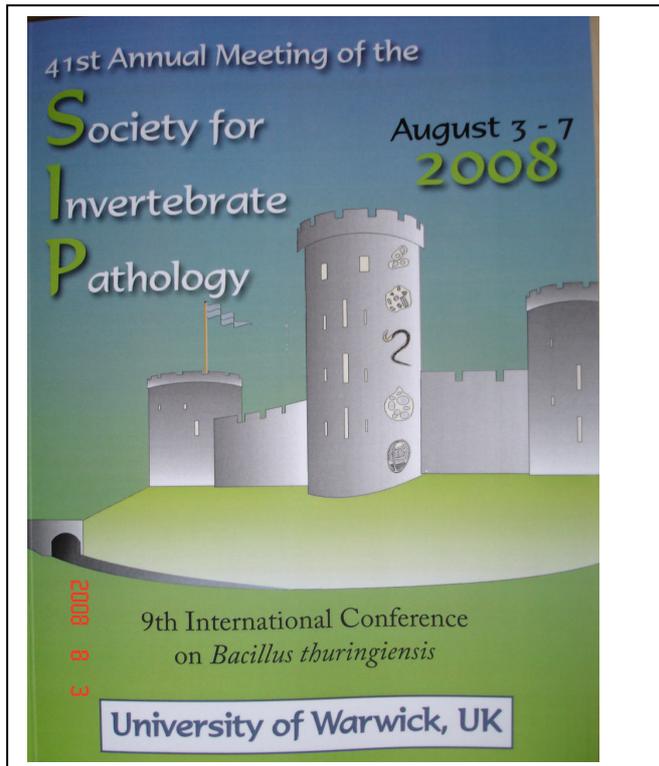
高穗生組長口頭論文報告



謝奉家助理研究員壁報論文展示



壁報論文討論



大會手冊封面