



# 微生物農藥研發進展與產業潛力

撰文/高穗生

## 前言

台灣地處熱帶與亞熱帶氣候，高溫多濕，病蟲害種類繁多，又因台灣農作物複種指數高，集約栽培的結果更導致病蟲害猖獗蔓延。長久以來農民為確保收成，多以施用化學農藥為主，以降低田間病蟲害密度，減少損失，維持作物產量和品質。邇來，隨著國際貿易之快速成長與 WTO 之參與，新病蟲害問題不斷發生，農民無藥可施，甚而使用非推薦之化學藥劑進行防治；又長期使用相同藥劑，致使病蟲害產生抗藥性，且短期或連續採收之作物，由於採期間仍有病蟲害發生，被迫噴藥防治，諸多因子使作物農藥殘留超過標準，引發消費者疑慮。另外，尚包括農藥對環境之污染，對非標的生物的傷害和生態平衡之破壞等諸多副作用。因此不論是為了降低對化學農藥之依賴性，或在有害生物綜合管理(Integrated Pest Management, IPM)的策略應用上，生物農藥均提供了另外一種安全、經濟且有效的選擇。

使用生物農藥優點包括：(1) 較傳統化學藥劑危險性少、專一性高。(2) 對人、畜、野生動物、害蟲的天敵和有益昆蟲無害。(3) 生物農藥使用少量即有效，分解快速，暴露風險低，無污染問題。(4) 無殘留量的問題，施用後可立即採收，不需訂定安全採收日期。(5) 可以和化學藥劑搭配使用，用於有害生物綜合管理，降低化學農藥使用量。(6) 不容易產生

抗藥性。(7) 研發費用低，容易登記上市等。本文參閱近年國內外生物農藥領域發表之論著，簡要地綜述生物農藥的新進展，包括多功能蘇力菌之開發、新型微生物蛋白質製劑、兼具殺蟲殺菌殺線蟲功能的光桿菌、白殭菌植物內生定殖和植物病蟲害防治等，並提出產業發展看法，以供各界參考。

## 多功能蘇力菌之開發

生物農藥中，最為人熟知和使用最多的微生物製劑，就是蘇力菌。蘇力菌除了能產生殺蟲結晶蛋白質，呈現對不同害蟲和線蟲的殺蟲效果外，尚能產生營養期殺蟲蛋白，雙效菌素 A，幾丁質酶，磷脂酶 C，酰基高絲氨酸內酯酶，細菌素，庫斯塔基胜肽，自溶素及氰化氫等，皆具有殺蟲或殺菌之功能，有些物質尚具有協力作用。此外，蘇力菌亦可產生吡啶-3-乙酸或茁長素，1-胺基環丙烷-羧酸脫胺酶，有溶磷之功能或產生載鐵物質，因而有促進植物生長和作為生物肥料的功能。

### (一) 蘇力菌可作為多功能生物防治劑

#### 1. 營養期殺蟲蛋白(vegetative insecticidal protein, Vip)

營養期殺蟲蛋白(vegetative insecticidal protein, Vip)曾在蘇力菌和仙人掌桿菌中的研究中被發現，其在對數生長期(log phase)大量表達，為可溶性胞外蛋白，與蘇力菌之 Cry 或 Cyt 毒素並無相似



性 (Nunez-Valdez, 1997)。這些蛋白可分三個階層 (Class) : Vip1、Vip2 和 Vip3, 8 個亞階 (subclass) : Vip1A、Vip1B、Vip1C、Vip1D、Vip2A、Vip2B、Vip3A 及 Vip3B, 共 81 種 Vip 蛋白 (Crickmore *et al.*, 2010)。不同類型的 Vips 分別有其對應的殺滅害蟲種類, 又由於其作用模式和殺蟲結晶蛋白有所不同, Vips 可以作為蘇力菌抗藥性管理策略之最佳候選者。目前已有基因轉殖植物表現 Vip 基因的研究成果, 如利用基改玉米表現 plant-optimized Vip3Aa1 基因 (Estruch *et al.*, 1998), 另也有表現 Vip3A 基因之基改棉花 (Cot102) 被開發出來 (EPA, 2003)。未來可持續找尋新穎的 Vip 基因序列, 以應用於廣泛殺蟲效果之基改作物開發, 同時可與殺蟲結晶蛋白協同進行抗藥性管理 (Rang *et al.*, 2005)。

## 2. 雙效菌素A(Zwittermicin A)

1990 年 Handelsman 等人從苜蓿根際分離到一株具防治苜蓿疫病 *Phytophthora medicaginis* 的仙人掌桿菌 (*Bacillus cereus* UW85), 可有效防治苜蓿猝倒病。另有研究發現, 某些蘇力菌品系能產生加強蘇力菌活性的物質, 此與仙人掌菌品系產生之抗生物質雙效菌素 A(Zwittermicin A) 結構相似 (Manker *et al.*, 1994)。雙效菌素 A 是一種線性氨基多元醇 (linear aminopolyol), 具熱穩定性與抗紫外線能力, 能抑制革蘭氏陽性和陰性的細菌, 及子囊菌和擔子菌綱等真菌之生長 (He *et al.*, 1994; Silo-suh *et al.*, 1998)。另有研究顯示其對疫病屬 (*Phytophthora* sp.)、腐黴病屬 (*Pythium* sp.) 及絲囊黴屬 (*Aphanomyces* sp.) 等植物病原菌有較高的抑制效果 (Osburn *et al.*, 1995; Silo-suh *et al.*, 1998; Shao *et al.*, 2005)。雙效菌素 A 並無殺蟲活性, 但與蘇力菌共同使用時, 能大幅提高蘇力菌毒蛋白的殺蟲活性, 是一種有效的協力劑, 可減少蘇力菌的使用量, 減少或延遲抗藥性的產生, 甚至可以拓寬蘇力菌的殺蟲範圍 (Broderick *et al.*, 2000)。

## 3. 幾丁質酶(chitinase)

幾丁質酶是最早從蘇力菌中發現的可溶性胞外蛋白質類殺蟲成分, 但單獨作用的殺蟲效果不高。有研究報告證實, 額外添加商品化的幾丁質酶, 能加強蘇力菌的殺蟲活性。

Regev 等人 (1996) 發現, 利用大腸桿菌表現黏質沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) 的幾丁質酶 A, 該重組蛋白對基因重組蘇力菌 (*B. thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin Cry1C) 之殺蓮紋夜蛾 (*Spodoptera littoralis*) 幼蟲具協力作用。另 Barboza-Corona 等人 (1999) 指出若一株蘇力菌同時含有殺蟲結晶蛋白及幾丁質酶, 對殺蟲活性具協力作用。但幾丁質酶增強蘇力菌的殺蟲效果, 其機制尚不明確。但有研究人員認為增加中腸內切幾丁質酶 (endochitinase) 會導致圍食膜 (peritrophic membrane) 之穿孔, 增加  $\delta$ -內毒素分子進入表皮膜 (epithelial membrane), 進而提升殺蟲之效果 (Regev *et al.*, 1996)。事實上, 蘇力菌幾丁質酶之潛力尚可延伸到植物病原真菌的防治。蘇力菌以色列亞種之幾丁質酶可抑制許多植物病原真菌的生長, 如對大豆種子白絹病 (*Sclerotium rolfsii*) 有 100% 抑制效果, 對土黴黴 (*Aspergillus terreus*)、黃黴黴 (*A. flavus*)、黑孢屬 (*Nigrospora* sp.)、根黴屬 (*Rhizopus* sp.)、黑黴黴 (*A. niger*)、鐮孢菌屬 (*Fusarium* sp.)、亮白黴黴 (*A. candidus*)、犁頭黴屬 (*Absidia* sp.) 和長蠕孢屬 (*Helminthosporium* sp.) 有 55% 至 82% 之抑菌效果; 對彎孢黴屬 (*Curvularia* sp.) 有 45%; 對煙黴黴 (*A. fumigates*) 則有 10% 之抑菌效果 (Reyes-Ramirez *et al.*, 2004)。

## 4. 磷脂酶C(phospholipase C)

磷脂酶 C(phospholipase C), 包括磷脂醯膽鹼特異的磷脂酶 (phosphatidylcholine specific phospholipase C, 簡稱 PC-PLC 或 PCH) 和磷脂醯肌醇特異的磷脂酶 (phosphatidylinositol specific phospholipase C, 簡稱 PI-PLC 或 PIH), 兩者對昆蟲腸道均具有破壞作用, 有助於細菌侵入血腔並繁殖 (Zhang, 1994)。

### 5. 醯基高絲氨酸內酯酶(acyl-homoserine lactonase, AHL-lactonase)

蘇力菌可經由一種新型式的微生物拮抗(即訊息干擾(signal interference))作用抑制植物病原菌蔬菜軟腐菌(*Erwinia carotovora*)的聚量效應因變因子(quorum-sensing dependent)之毒力(virulence)。蔬菜軟腐菌能產生醯基高絲氨酸內酯(acyl-homoserine lactone)之 quorum-sensing 訊息,並與之反應,來調節該細菌抗生素之產生和毒力基因之表現;而蘇力菌則具有醯基高絲氨酸內酯酶(AHL-lactonase),其為一種強力之醯基高絲氨酸內酯之降解酵素。蘇力菌不會干擾蔬菜軟腐菌之正常生長,但會破壞醯基高絲氨酸內酯訊息之累積,也會抑制蔬菜軟腐菌之毒力,明顯地降低蔬菜軟腐菌在馬鈴薯上感染之流行率(incidence)和病徵之發展。研究指出蘇力菌之生物防治效力和其產生醯基高絲氨酸內酯酶之能力有關(Dong, *et al.*, 2004)。

### 6. 細菌素(bacteriocin)

多數已知細菌素產生菌,是來自土壤或食物的芽孢桿菌分離株。目前已發現某些蘇力菌菌株所產生的細菌素,具殺菌之效果(bactericidal),如蘇力菌 BMG17 產生的 thuricin 7(Cherif *et al.*, 2001)、蘇力菌勵木亞種(*Bt tochiensis*, HD868)產生的 tochicin(Paik *et al.*, 1997)、蘇力菌 B439 產生 thuricin 439A 和 439B(Ahern *et al.*, 2003)、蘇力菌庫斯塔基亞種(*Bt kurstaki*, BUPM4)產生的 bacthuricin F4(Kamoun *et al.*, 2005)、蘇力菌 NEB17 產生 thuricin 17(Gray *et al.*, 2006)、蘇力菌殺蟲亞種(*Bt entomocidus* HD9)產生 entomocin 9(Cherif *et al.*, 2003)、蘇力菌殺蟲亞種(*Bt entomocidus* HD110)產生 entomocin 110(Cherif *et al.*, 2006)等。

### 7. 庫斯塔基胜肽(kurstakins)

Hathout 等人(2000)發現,自 *B.t. kurstaki*. HD-1 可分離出 4 種脂胜肽,對葡萄穗黴菌(*Stachybotrys charatim*)有抑菌效果。

### 8. 自溶素(autolysins)

自溶素為內生性的細菌肽聚糖水解酶(endogenous peptidoglycan hydrolases),能夠分解細菌的細胞壁上細菌肽聚糖。經進行 112 株蘇力菌品系之自溶表現型分析(characterization of autolytic phenotype)後,發現在鹼性 pH 時,七個主要蛋白質呈現細菌肽聚糖水解酶的活性;數種蛋白質保有溶解其他細菌的活性(Raddadi *et al.*, 2004; 2005),此類蛋白質對於蘇力菌在田間之應用有所助益。

### 9. 氰化氫(HCN)

氰化氫被認為是一種廣效性的抗微生物物質,由根圈之螢光假單孢菌產生,用以防治植物根部病害(Sharifi-Tehrani *et al.*, 1998; Blumer and Haas, 2000; Ramette *et al.*, 2003)。Raddadi 等人(2008)以生體外(*in vitro*)方式,初步篩選能產生氰化氫的蘇力菌,發現 16 株中有 7 株能產生氰化氫。

### (二) 蘇力菌可作為刺激植物生長之生物肥料

Raddadi 等人(2008)利用 PCR 和表現型測試,篩選 16 株蘇力菌調查其植物生長促進的特性,發現 13 株蘇力菌擁有一種以上的植物生長促進特性,顯示其表現數種植物生長促進決定因子(determinants),可在田間使用,增進植物之生長。

### 1. 吲哚-3-乙酸或茁長素(indole-3-acetic acid, IAA或 auxins)

植物荷爾蒙對植物信息傳遞和生長發育的調節扮演重要角色。其中 IAA 為研究最透徹的植物生長調節劑。Raddadi 等人(2008)測試的 16 株蘇力菌發現均能產生 IAA,最高濃度為 6.9-9.71 $\mu\text{gml}^{-1}$ ,此 IAA 濃度不會造成植物發病,且能促進植物生長。細菌分泌 IAA 可以直接刺激植物細胞延長或細胞分裂,間接影響細菌胺基環丙烷-羧酸脫胺酶之活性,而促進植物生長(Penrose *et al.*, 2001)。

### 2. 1-胺基環丙烷-羧酸脫胺酶(1-aminocyclo-propane-1-carboxylate, ACC deaminase, ACCD)



1- 胺基環丙烷 - 羧酸 (1-aminocyclo-propane-1-carboxylic acid, ACC) 是一種自然產生的氨基酸，為乙烯之前驅物 (precursor)，為植物正常發育和對抗逆境的重要植物荷爾蒙 (phytohormone)。微生物含有 1- 胺基環丙烷 - 羧酸脫胺酶 (ACCD) 能將 ACC 轉化為  $\alpha$ -丁酮酸鹽和銨 (Hontzeas *et al.*, 2004)，而 ACCD 存在於許多促進植物生長的細菌中 (Wenbo *et al.*, Ghosh *et al.*, Glick, 2005; Raddadi *et al.*, 2007)，使得微生物利用 ACC 作為單一氮源或碳氮源 (Belimov *et al.*, 2005)。ACCD 除了能降低乙烯之濃度，有助於植物根系的生長外，能表現 ACCD 的促進植物生長菌，尚能保護植物對抗逆境，包括重金屬 (Burd *et al.*, 2000; Belimov *et al.*, 2005)、澇 (Grichko and Glick, 2001)、鹽 (Mayak *et al.*, 2004a)、乾旱 (Mayak *et al.*, 2004b) 和植物病原菌 (Wang *et al.*, 2000)。Raddadi 等人 (2008) 調查 16 株蘇力菌發現均含有 ACCD 基因，其中 7 株可在僅含 ACC 作為唯一氮源的培養基中生長。

### 3. 溶磷作用(Phosphate solubilization)

溶磷細菌大多為土壤細菌，能經由酵素作用，將不可溶解之磷轉變成可溶的形式 (Goldstein, 1986; Pal, 1998; Rodriguez and Fraga, 1999; Nautiyal *et al.*, 2000)。促進植物生長之根圈細菌，能溶解根圈之磷，增進植物對營養的吸收 (Richardson, 2001)。經由 PCR 分析，測試 16 株蘇力菌發現均含磷酸酶基因，某些品系亦含有植酸酶基因，在生體外 (in vitro) 試驗時，顯示有高的溶磷能力 (Raddadi *et al.*, 2008)。

### 4. 產生載鐵物質(siderophore)

植物生長和繁殖會受到不同生物和非生物逆境之嚴重影響。其中非生物逆境中，特別是石灰質土壤，鐵質特別低，因此缺鐵是導致植物產量減少的重要因子 (Kobayashi *et al.*, 2005)。植物會分泌可溶的有機物如螯合劑 (chelator) 和植物載鐵物質 (Phytosiderophores)，能抓住鐵離子並使之維持於溶

液中。據 Raddadi 等人 (2008) 之研究，蘇力菌亦會產生載鐵物質，因而可以和植物病原真菌競爭鐵，提供植物之鐵質。

### 新型微生物蛋白製劑

新型微生物蛋白製劑主要是蛋白質激發子類 (protein elicitor) 物質，不直接消滅病蟲害，而是激發植物本身抗病防蟲的基因表現，並促進植物生長。其中較具代表性的有過敏蛋白 (harpin)、隱地蛋白 (cryptogein) 及激活蛋白 (activator)。

#### (一) 過敏蛋白(harpin)(Jones, 2001)

康乃爾大學魏忠民等人 (1992) 發現，解澱粉軟腐菌 (*Erwinia amylovora*) 能產生過敏蛋白，引起植物產生過敏反應。隨後，美國 EDEN Bioscience，進一步研究該蛋白質，並開發成商品 Messenger<sup>®</sup>，於 2000 年取得美國環保署的核准，定位為生化製劑。研究發現，當過敏蛋白施用到植物上，與植物接受器 (receptor) 結合，開始一系列複雜的訊息傳送途徑 (signaling pathway)，包括活化系統獲得抗性 (systemic acquired resistance, SAR) 基因、誘發茉莉酸 / 乙烯 (jasmonic acid/ ethylene) 依變 (dependent) 途徑、激發植物生長有關的系統等。

上述反應能保護植物，使多種作物不受病蟲危害，同時促進生長，提升產量和品質。由小麥、稻米、柑桔、青椒和瓜類作物田間試驗結果，顯示過敏蛋白促進植物生長是由於下列一種或數種原因所致：(1) 增加光合作用；(2) 增加養分吸收；(3) 增加生物量；(4) 增加根部發展；(5) 增加種子發芽；(6) 提早開花；(7) 改善果實發育；(8) 提早果實成熟。研究指出過敏蛋白能有效防治目前無化學藥劑可防治的植物病毒，如番茄和青椒的菸草與胡瓜嵌紋病毒、菸草的菸草嵌紋病毒以及青椒的甜菜捲頂病毒 (curly-top virus)。用 Messenger<sup>®</sup> 處理的番茄亦可減少結癭 (galling)，還可有效管理番茄、胡瓜、草莓和小麥等之土媒病害如镰胞菌 (*Fusarium spp.*)。過敏蛋白並不會殺死害蟲和病原菌，因此不會造成選



汰壓力，不會使有害生物產生抗藥性，適合於防治對化學藥劑產生抗性之有害生物。

## (二) 隱地蛋白(cryptogein)

除了菸草疫病 (*P. nicotianae*) 外，疫病菌屬 (*Phytophthora* spp.) 會誘發其非寄主植物菸草產生類過敏性壞死 (hypersensitive-like necroses)，這些疫病菌之培養液會分泌激發子，使菸草免於菸草疫病之攻擊。隱地蛋白是由隱地疫病 (*P. cryptogea*) 所分泌，訂名為一種激發素 (elicitin)(Terce-Laforgue *et al.*, 1992)。隱地蛋白在極低濃度下就可誘導菸草產生過敏性反應，並使植株獲較大範圍的抗病性，同時會產生與防禦性反應相關的物質如乙烯、植物保衛素 (phytoalexin)、發病機制相關蛋白 (pathogenesis-related proteins) 等 (Milat *et al.*, 1991)。Zhang 等人 (1999) 從棕櫚疫病 (*P. palmivora*) 的培養中分離出不含糖基的耐熱蛋白，能誘導菸草葉片產生過敏性壞死，根據推測此蛋白亦屬於激發素類的激發子。

## (三) 激活蛋白(activator)

學者從鏈格孢屬 (*Alternaria* spp.)、立枯絲核菌 (*Rhizoctonia solani*)、麴菌 (*Aspergillus* spp.)、灰黴菌 (*Botrytis* spp.)、稻熱病 (*Piricularia oryzae*)、青黴菌 (*Penicillium* spp.)、木黴菌 (*Trichoderma* spp.) 和鐮胞菌 (*Fusarium* spp.) 等多種真菌中篩選分離純化出一種新型蛋白，其胺基酸和核苷酸序列分析顯示，該蛋白不同於過敏蛋白和隱地蛋白 (Qiu, 2004; 2006)，根據作用機制，將此蛋白命名為激活蛋白 (activator)。激活蛋白不誘導菸草植株的過敏反應，透過激活植物體內分子免疫系統，提高植物自身之免疫力；經過激發植物體內一系列代謝之調控，促進植物根莖葉的生長和葉綠素含量提高，因而達到提高作物產量的目的。

## 具殺蟲、殺菌及殺線蟲功能的光桿菌

光桿菌 (*Photobacterium luminescens*) 屬於腸內桿菌科 (Enterobacteriaceae)，為革蘭氏陰性，可發出

冷光 (bioluminescent) 的桿菌細菌，可與嗜菌異小桿線蟲 (*Heterorhabdits bacteriophora*) 共生。筆者實驗室在 2004 年開始參與行政院農業委員會農業生物技術國家型計畫，利用大蠟蛾誘餌法 (*Galleria-bait*) 進行台灣本土異小桿線蟲蒐集，2005 年首度篩獲本土異小桿線蟲—短尾異小桿線蟲，並已累計篩獲 6 隻台灣本土異小桿線蟲—短尾異小桿線蟲。由於短尾異小桿線蟲與光桿菌共生，故接著自線蟲體內採集、分離與篩選光桿菌菌株，已有 15 株共生細菌已經依細菌的形態、生化試驗與 16 S rRNA 等方法，確認為本土光桿菌菌株 (*P. luminescens* subsp. *Akhurstii*)(Hsieh *et al.*, 2005; Hsieh *et al.*, 2007)。

## (一) 殺蟲毒蛋白

美國 Wisconsin 大學的科學家從寄生在嗜菌異小桿線蟲消化道內的一種光桿菌中找到一個蛋白複合物 (Bowen *et al.*, 1998)，其除了對鱗翅目具有殺蟲活性外，鞘翅目和雙翅目也都有很強的毒殺活性，是一種廣譜殺蟲物質，這些發現可能產生出新的防治蟲害方法，例如可經量產純化直接噴灑該毒素，以防治害蟲，或者是將毒素基因選殖於植物中表現，對於農作物持久性抗蟲育種具有很大的應用潛力。光桿菌毒蛋白複合體為外分泌型，分子量大於 100kDa，其活性作用部位位於害蟲中腸，由於毒蛋白的基因簇 (genomic islands) 較大，遺傳操作較難 (Waterfield *et al.*, 2002; French-Constant *et al.*, 2003)。研究人員陸續發現其它與殺蟲有關的毒素，如 Mcf 毒素 (makes caterpillars floppy toxin) 等 (Daborn *et al.*, 2002; Makrokhazi *et al.*, 2003)，Mcf 可能是共生細菌中最基本的毒素，存在於所有光桿菌菌株中，主要破壞昆蟲中腸上皮細胞 (Daborn *et al.*, 2002)，但嚴格的胞內作用路徑仍然未知 (Dowling *et al.*, 2004)。雖然目前文獻發表了許多殺蟲毒蛋白的核酸和胺基酸序列，對於殺蟲毒蛋白的種類、修飾方式、分泌類型、殺蟲機制、結構組成等方面，仍有待進一步研究 (Clarke and Dowds,



1995; Daborn *et al.*, 2001)。

## (二) 抗生物質

產生抗生物質是共生菌的普通特徵。多種抗生物質阻止了來自腸道和土壤環境中的微生物對蟲屍的二次感染，還可抑制其它昆蟲對被侵染昆蟲屍體的取食以及共生菌之間的競爭 (You, 2005)。不同種或同種不同菌株產生的抗生物質各不相同，大蠟蛾體內光桿菌 C9 菌株產生抗生複合物 (3, 5-二羥基-4-異丙基-二苯乙烯) 抑制幼蟲腸道細菌 (Hu and Webster, 2000)。菌株 K122 產生 13 種小分子有機化合物，對細菌、真菌及其它種的線蟲有抑制作用。這些抗生物質可能由多聚亞胺合成酶基因控制合成，該基因在許多光桿菌基因組樣品中都有發現 (Ffench-constant *et al.*, 2000)。光桿菌對病原細菌和真菌具有較廣譜拮抗性，尤其對植物病原真菌有較強的抑制效果，但目前相關抑菌成分仍只有極少數被研究或確認 (Paul *et al.*, 1981; McInerney *et al.*, 1991a; Chen *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1995a; 1995b)。

## (三) 殺蟲、殺菌及殺線蟲

筆者實驗室利用光桿菌代謝產物 - 毒蛋白複合體 (分子量大於 100kDa)，針對於台灣本土重要害蟲，如小菜蛾、大蠟蛾、玉米穗蟲、斜紋夜蛾、擬尺蠖與甜菜夜蛾等鱗翅目昆蟲進行室內殺蟲譜試驗，顯示其具有顯著殺蟲效果，是一種廣譜殺蟲蛋白；對於測試之病原真菌亦具有廣譜拮抗性。另有報告顯示光桿菌 (*P. luminescens* subsp. *laumondii*) 之 GPS12 及 GPS11 品系，對洋菇害蟻 (*Luciaphours* sp. 矮蒲蟻科) 雌蟻能造成很高的致死率 (Bussaman *et al.*, 2006)。另光桿菌 (*P. temperate*) 對西方薊馬和蔥薊馬均有良好的殺蟲活性 (Gerritsen *et al.*, 2005)。為瞭解光桿菌菌液對植物病原真菌的抑制效果，本實驗室進行玫瑰灰黴病菌、檬果炭疽病菌、蘋果褐斑病菌、甜椒疫病菌、香蕉炭疽病菌、百合灰黴病菌、豌豆镰胞菌、番茄镰胞菌、水稻立枯絲核菌與百合白絹病菌的對峙試驗。試驗結果顯示除了對百

合白絹病菌沒有明顯抑制效果外，對於其他 9 種植物病原真菌都有明顯抑制效果，尤其對於玫瑰灰黴病菌、檬果炭疽病菌、蘋果褐斑病菌、甜椒疫病菌具有相當顯著抑菌效果。其中，我們也針對檬果炭疽病菌進行檬果生物檢定 (bioassay)，證實光桿菌菌液有良好的防治效果。另外，進行光桿菌”菌體及其代謝產物混合液”對細菌的抑制試驗，結果發現對於仙人掌菌、沙門氏菌、大腸桿菌、黑腐病原細菌、胡蘿蔔軟腐桿菌與菊花軟腐桿菌等 6 種細菌全部都有明顯的抑菌效果 (Hsieh *et al.*, 2004; Hsieh *et al.*, 2005; Hsieh *et al.* 2006)；另也有研究發現光桿菌的抗生物質可以殺死松材線蟲 (Hu *et al.*, 1999)。

## 蟲生真菌植物內生定殖與病蟲害防治

過去 45 年，昆蟲病理學家曾對真菌病原 (fungal entomopathogen) 的潛力寄予厚望。雖然在田間有明確且明顯的進展，但仍克服不了基本的障礙 (如：含水量的限制，紫外線，製劑配方)，這些障礙阻止了蟲生病原真菌被充分商品化和廣泛使用。蟲生真菌可為自然發生的真菌內生菌，亦可經接種到植物上，使其成為內生菌。利用蟲生真菌內生菌進行植物病蟲害防治，可以克服將蟲生真菌作為傳統微生物製劑施用時遭遇的瓶頸；蟲生真菌內生菌可在植物內殺死幼蟲和抑制病原菌，不受不良的生物和非生物因子的影響，只需少許接種量，減少花費。

### (一) 蟲生真菌內生菌之防蟲應用

當含有內生蟲生病原真菌的植物，其內害蟲表現時，可臆測在植物組織內之真菌，由於代謝物之產生，對害蟲會造成取食阻礙 (feeding deterrence) 或抗生作用 (antibiosis) (Vega *et al.*, 2008)。有關蟲生真菌內生菌之前驅研究是以玉米、白殭菌和歐洲玉米螟 (*Ostrinia nubilalis*) 作為模式系統。白殭菌以液態或粒劑施用到玉米植株上，評估其減少玉米螟在玉米莖上的穿孔情況，確認生長期間對玉米螟之抑制效果。Lewis 和 Bing (1991) 研究認為白殭菌對玉米螟之抑制是由於該菌在玉米植株內定殖



之故，並進一步證實有內生菌的關係 (endophytic relationship)。Cherry 等人 (1999、2004) 在非洲，將玉米種子以白殭菌分生孢子乾粉處理，或以分生孢子懸浮液噴灑於葉，或在玉米莖注射孢子懸浮液的方式，產生內生作用來防治非洲大螟 (*Sesamia calamistis* Hampson)，發現經處理後植物受害蟲孔數減少，經白殭菌注射後，玉米植株上之幼蟲體重較對照組為輕，顯示取食減少，亦支持取食阻礙或抗生作用的理論。

將內生菌白殭菌引入玉米，可和其他蟲害防治策略搭配，內生菌白殭菌可以和蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis*) 及加保扶 (carbofuran) 之施用相搭配用以防治歐洲玉米螟。Vega 等人 (2008) 於夏威夷、哥倫比亞、墨西哥及波多黎各之咖啡樹調查真菌內生菌時，發現有許多蟲生真菌屬，包括頂孢黴屬、白殭菌屬、枝孢屬、螺旋聚孢黴屬及擬青黴菌屬的真菌。其中白殭菌和粉紅螺旋聚孢黴對咖啡果小蠹蟲 (*Hypothenemus hampei* Ferrari) 具病原性；Akello 等人 (2007) 之研究顯示，白殭菌內生菌能顯著地使香蕉球莖象鼻蟲 (*Cosmopolites sordidus*) 幼蟲減少。

## (二) 白殭菌對植物病原菌的抑菌活性及作為內生菌之植物病害防治應用

近年來白殭菌被視為具有雙重功能的微生物，能對付害蟲和植物病原菌。白殭菌的分離株在生體外 (*in vitro*) 的測試，顯示能抑制許多土媒和葉面病原菌之菌株生長，包括小麥全蝕病菌 (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) (Renwick *et al.*, 1991)、蜜環菌 (*Armillaria mellea*) 和褐座堅殼菌 (*Rosellinia necatrix*) (Reisenzein and Tiefenbrunner, 1997)、尖鏟胞菌 (*Fusarium oxysporum*) (Reisenzein and Tiefenbrunner, 1997; Brak *et al.*, 1996)、蝴蝶蘭灰黴菌 (*Botrytis cinerea*) (Brak *et al.*, 1996)，和立枯絲枯菌 (*Rhizoctonia solani*) (Lee *et al.*, 1999)。除了能抑制菌絲生長外，白殭菌尚可引起植物病原菌之細胞溶解如終極腐黴菌

(*Pythium ultimum*)、德巴利腐黴菌 (*P. debaryanum*) 和小麥穎枯病菌 (*Septoria nodorum*) (Vesely and Koubova, 1994)。白殭菌在盆栽測試時對小麥全蝕病菌具有良好和一致的防治效果 (Renwick *et al.*, 1991)；在溫室和田間試驗顯示，白殭菌施用到洋蔥球莖時能明顯地減少洋蔥黃萎病 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae*) (Flori and Roberti, 1993)。白殭菌可以保護番茄，不受立枯絲枯菌 (Bishop, 1999; Seth, 2001; Ownley *et al.*, 2000; Ownley *et al.*, 2004) 和薑軟腐病菌 (*Pythium myriotylum*) (Clark, 2006; Clark *et al.*, 2006) 造成苗期病害。Ownley 等人 (2008) 亦證實種子施用白殭菌 11-28，會使得番茄和棉花幼苗產生內生定殖，能防治植物病原真菌立枯絲枯菌和薑軟腐病。在棉花幼苗經白殭菌 11-28 處理後誘發其對地毯草黃單孢菌 (*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvarcerum*) 之系統抗病性。

## (三) 殺蟲抑菌可能的原因

白殭菌屬能產生數種代謝產物包括白殭菌黃色素 (bassianin)、白殭素 (beauvericin)、球孢交質 (bassianolide)、膽固醇醯基酶抑制劑 (beauveriolide)、白殭蝗毒素 (bassiacridin)、卵孢菌素 (oosporein) 及軟白殭菌素 (tenellin)。白殭菌素對熱帶家蚊 (*Culex pipiens* L.) 有毒性，會破壞其中腸的表皮，溶解其核糖體 (ribosomes)，對埃及斑蚊 (*Aedes aegypti*) 和紅頭麗蠅 (*Calliphora erythrocephala*) 亦有毒。但白殭菌素對玉米穗蟲 (*Helicoverpa zea*) 無毒，而球孢交質則會造成短暫之弛緩 (atony)。玫烟色擬青黴菌 (*P. fumosoroseus*) 會產生白殭菌素和膽固醇醯基酶抑制劑，蠟蚧輪枝菌也能產生球孢交質，棒束孢屬真菌產生之代謝產物為棒束孢素 (isarin)，細腳擬青黴菌 (*P. tenuipes*) 則產生細腳擬青黴素 (tenuipesine)。由於蟲生真菌產生相關的代謝產物對害蟲有效，同時兼有抑制真菌和細菌的功能。Lee 等人 (2005) 調查 47 種蟲生真菌有 81% 能產生抗芽孢桿菌 (*Bacillus*) 之物質，



64% 能產生抗葡萄球菌 (*Staphylococcus*) 物質。卵孢菌素和白殭素亦具有抗細菌之效果。

## 微生物製劑開發之困境

### (一) 研究方面

政府補助各研究機關和大專院校，研究項目，經費少而分散，又由於資助來源不同管考單位，使得研究項目有所重複，加上研究人員喜單兵作戰，分工合作意願不高，導致研發遲滯，使得研究結果，不易落實商品化。

### (二) 技術移轉方面

國內學術界自行研發成果，在技術移轉上標準不夠嚴格，在相關必備資訊不完備情況下，單憑主持人認定及撰妥計畫後即可申請技術移轉，造成承接公司在投入資金後，才發現問題所在，又需投入大筆經費解決問題。

### (三) 產業界方面

目前產業被跨國大企業把持，中小企業研發薄弱，人才不足，缺乏開發國際市場之經驗。相關產業尚未成型，無群聚作用。加上產業界投資經驗不足，意願不高，資金籌措困難，亦使得微生物製劑發展受到影響。

### (四) 在應用方面

生產成本高，加上田間應用技術複雜，使用次數多，人工和用藥成本上升，造成植物保護用微生物製劑較化學農藥之競爭力為低。農民對微生物製劑之優點和使用技術認識不足，使得在推廣應用上進展緩慢。

### (五) 法規制度和執行方面

申請微生物農藥工廠設廠登記需向當地縣(市)政府建設局申請，行文會同環保局、衛生局、農業委員會、工業局、勞工安全委員會等。縣(市)政府評鑑查廠，令出多門，聯繫相關單位，曠日費時。又

微生物農藥、環境衛生用微生物製劑和微生物肥料等產品均以發酵方式生產，原料亦相似，但限於法令規定，設備不能互通，以致空間設備，土地，廠房利用率低，反而必需再重複投資，使業者負擔沉重。雖然微生物農藥有完善的管理法規，但是限於人手不足，取締乏力，致地下微生物農藥工廠充斥，未登記且無品質管制、良莠不齊的偽藥於市場販售且售價偏低，形成劣幣逐良幣之現象。由於品質欠佳，使得農民對於微生物農藥之缺乏信心，因而減少採購和使用的意願，惡性循環的結果，合法產品的銷售和營運受到相當大的打擊。

## 微生物製劑發展與產業推動之建議

### (一) 加強團隊研究

研究主題之研提，除了專家學者對研究題目作專業審查外，更應引進市場評估機制，以瞭解企業或投資公司投入該項計畫的意願，方能增加計畫之競爭性和創新性。目前產學合作計畫之推出，即是一個順應世界潮流的良好政策。另外，政府主管機關在研究經費上應酌予寬列，並作重點補助。至於值得開發之植物保護微生物製劑產品，應該著重於習用已久，安全，設備投資較小，量產及登記容易，在國際市場有競爭能力之本土微生物種類，包括應用於蟲害防治之蘇力菌、核多角體病毒及蟲生真菌等。及用於植物病害防治用之枯草桿菌、放線菌、木黴菌、螢光假單孢菌及粘帚黴菌等。

國內微生物製劑研發人員，特別是製劑配方和發酵產程方面，嚴重不足，教育部在教程規劃時應加強此類專業人員之培育。再者，研究人力分散在各研究大專院校之中，對整個產業的發展相當不利。應就國內現有研究單位的人力作一定程度之增補和整合，組成含有微生物學家、植物病理學家、昆蟲學家、發酵產程專業之化工專家、製劑配方專業之應用化學家、毒理學家的一個跨學門研究團隊，集合產官學研的力量共同投入，形成一個有機體，使上、中、下游的開發有縱向的分工，成員間橫



向的聯繫，支援管道暢通，這種跨學門整合性之團隊，才可以發揮所長，短期內必有所成。

此外，建置生物農藥先導工廠，將有助於累積量產經驗，加速產品開發。農業藥物毒物試驗所長年重視微生物製劑之研發，並有多項成果亟待移轉廠商量產。因此，若在現有之設備基礎上予以適當之擴充，包括試量產之酵槽、減壓濃縮裝置等，即可建立示範之微生物製劑先導工廠，進而輔導接受技術轉移之廠商，以利迅速獲得實際操作經驗，提早產品之上市。

## （二）與中國大陸之競合

中國大陸地大物博，微生物資源極為豐富亦具多樣性，從事微生物製劑研究之科研單位和大專院校學術基礎紮實，專業人力充沛，敬業而有經驗。再加上生產原料來源取得方便，價格低廉，初級人力之薪資低，使得微生物製劑之生產成本相對的比較低，而有市場之競爭力。此外，中國微生物製劑研發之困境，諸如製劑配方技術落後及研發與生產脫節等，也是國內要面對解決的問題。所謂「他山之石可以攻錯」，衡量中國大陸之優缺點和國內之長處和短處，個人認為未來微生物製劑之研究開發應將中國大陸作為借鏡，經由整合截長補短，相輔相成，策略上因應之道如下：

1. 對國內廠商而言，可以經過評估後，引進中國大陸已經篩選改良之優良菌種，具有高毒力、廣殺蟲譜、抗逆境、高產量之特性，在國內進行發酵量產和製劑配方之工作，使之商品化。換言之，與中國大陸的基礎研究進行垂直整合，共同創造兩岸微生物製劑產業的利基。
2. 國內廠商可以委託代工的模式，委請中國大陸知名的微生物製劑研發單位和工廠，生產製劑產品，共同訂定品管要求，並實際駐廠，協助品管部門嚴格把關，確定產品之質量。汽巴嘉基公司與湖北農科院Bt研發中心之合作即是一個成功的案例。目前Bt研發中心已成為蘇力菌生產基地，產品

之品質均達國際水準，兩造均蒙其利。

3. 國內研發單位和大專院校專業研究人員，可以借重中國大陸科研單位的人力和豐沛的微生物資源，協助蒐集優良菌株。可以合作方式由對方先行篩選和初步改良，而由我方進一步確認和進一步改良，或由我方逕赴對岸採集，由對方協助支援。無論何種方式，所獲得之菌種，均為兩岸所共有共享，我方則繼續進行中下、游之開發工作，使優良菌種得以產業化，商品化。

## （三）加強國際合作，推動植物保護用微生物製劑產業的國際化

國際上一些大型的跨國農藥公司，對產品的創新，頗為重視，均投入相當大的經費在研究開發，並聘用大量優秀的研究人員，因此有許多前瞻性的產品上市。在台灣如果任何一種產業要生根立足，必需要國際化，根據我國現況，在成果分享的前提下，發展與跨國公司的合作，勢在必行，利用國外資金、技術和管理行銷的手段，擴大產業規模，降低成本，提高經營人材的素質。增加我國創新和經營管理的能力，並提高產業化的水準，如此才能將產品國際化。

## （四）政府政策之支持及法規之健全

政府在產業輔導，租稅減免，財務協助和投資貸款方面，均有相關獎勵措施。但產業界並未充分明瞭申請資格、手續等資訊，應廣為宣傳，使政策更能落實。另外，微生物農藥工廠設廠登記，程序煩瑣，門檻過高，應設立單一窗口，簡化申請流程，降低門檻。又，限制以發酵方式，同時生產微生物農藥、環境用微生物製劑及微生物肥料之法令建議應予修正、鬆綁，以方便生產線之規劃，朝多元化發展，使投入之設備充分發揮產能。同時對地下微生物農藥工廠及偽藥之取締上，亦應痛下決心，充實人力，嚴加控管以維護廠商的權益。中央政府應就各相關部會補助學術及科研機構研發之成果，加以歸類和整合，就技術移轉案件之品質，建立起嚴



格慎密之審核制度，並加強專利資料及專利地圖等檔案之建制，以杜絕品質不良之研發成果，草率地移轉，造成業界的損失。

制定鼓勵使用植物保護用微生物製劑之政策，積極推動減少化學農藥使用的方案，建立有利於環境保護生態平衡之綜合性病蟲害管理 (Integrated Pest Management, IPM) 技術，以維持農業永續經營。增加農民教育之投入，提高農民的素質，使農民對環境保護和生態平衡之重要性有更清楚的認識，增進農民對使用微生物製劑之意願和瞭解。加強大眾傳播對微生物製劑之宣導，鼓勵更多的企業或投資公司投入微生物製劑之研發和生產，而一般消費大眾也能充分瞭解微生物製劑之優點，樂於採購使用微生物製劑所生產之農產品。另外，應加強對有意從事生物農藥產業之業者、地方環保局及建設局承辦人員的教育訓練，使其對生物農藥產業有充分的認識，業務承辦人員能專業積極地協辦相關業務，促進廠商踴躍投資，加速生物農藥產品之商品化。

## 結論

由於微生物製劑對天敵、人、畜、植物安全無毒選擇性強，不會污染空氣、水域和土壤，具有保護環境品質的特性和優點，開發成本低，病蟲害亦不易產生抗性，某些害蟲病原微生物尚具有長期防蟲的作用，是頗值重視的一種非化學農藥防治技術。但微生物防治並不能完全取代其他防治，單獨應用也有其不足之處，因此與化學防治等其他措施不應相互排斥，而必須相互密切配合，裁長補短相輔相成，在綜合病蟲害防治體系中共同發揮應有的協調作用。

雖然近年來微生物防治在台灣有突飛猛進的成果，但不容諱言的，本土性微生物製劑之工業化、標準化和商品化生產問題仍待解決，突顯產品量少，滿足不了農民需求之瓶頸。同時面臨西方高科技生物及遺傳工程產品之衝擊。對國內植物保護用

微生物製劑之研究方向以及產業推動方面，吾人有下列數項期許提供同好共勉：(1) 重視本土性微生物資源之調查、篩選、鑑定和品系改良。(2) 利用分子生物學和遺傳工程技術，開發嶄新的微生物製劑或基因轉殖作物。(3) 瞭解微生物製劑的作用機制。(4) 建立田間施用技術。(5) 建立大量生產流程之技術。(6) 開發新製劑配方和品質管制的研究。此外，建議草擬基因轉殖微生物製劑農藥管理辦法，建置核心設施，以因應基因轉殖微生物製劑農藥開發試驗研究及註冊登記之需求。而且，生物農藥之名稱也建議改為植物保護用生物製劑，與化學農藥有明顯的區隔，與有毒及高污染產業有所切割，避免不必要的排斥與誤解，以利產業的投入和發展。

AgBIO

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 組長