

# 基因轉殖植物在蟲害防治上的利用

曾經洲 高穗生

自然界中植物與昆蟲共同演化 (co-evolution) 了40億年，也各自發展出本身的防衛系統。人類爲了栽培作物的增產，先是利用自然的方法，或自然界中可得的物質來防治害蟲，而後有了合成殺蟲劑 (有機氯、有機磷、胺基甲酸鹽、合成除蟲菊等)，近三十年來更有蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 的上市。蘇力菌不同品系會有不同的殺蟲基因產生毒蛋白，對付不同目的害蟲，但已有產生抗性的報告，自1984年更進入了蘇力菌基因轉殖植物的時代。近十年蛋白酶抑制劑及植物血球凝集素之研究開發利用亦逐漸展開中。

## 前 言

抗蟲因子 (insect control agents) 最早被利用於轉殖植物，目前已有蘇力菌 $\delta$ -內毒素 (delta-endotoxin) 和胰蛋白酶抑制劑 (proteinase inhibitors, PI) 兩種因子被有效利用 (Brunke and Meeusen, 1991)。

過去遺傳學家以雜交、突變、選種、細胞組織培養等技術進行育種改良，近年來基因工程 (genetic engineering) 逐漸發展，基因重組技術 (recombinat DNA technology) 爲遺傳工程及生物技術發展的原動力，它提供純化的 DNA 片段，加以分析改造，於生體內 (in vivo) 或生體外 (in vitro) 生產大量特殊需要的基因產物。

Gasser 和 Farely (1989) 解釋基因轉殖的主要步驟為：(一)構築一質體 (plasmid) DNA，含有農桿菌 (*Agrobacterium*) 載體 (vector) 之啟始基因 (Ori-Agro)，以便轉殖入植物染色體中；有大腸菌之啟始基因 (Ori-*E. coli*) 以便在 *E. coli* 中大量複製；有抗 spectinomycin 之基因，以便作微生物內大量複製之篩選；另外是插入目標作物中的一段，含抗 kanamycin 之基因，以便在轉殖後篩除不具抗蟲因子的植株；以及所插入之目的基因。(二)將此質體 DNA 放入 *E. coli* 中大量複製。(三)與農桿菌菌體雜交 (mating)，使質體 DNA 進入腫瘤農桿菌中。(四)感染植物細胞，將目的基因帶入植物染色體中。

導入之方法除腫瘤農桿菌 (*A. tumefaciens*)，還有生根農桿菌 (*A. rhizogenes*) 導入細胞質、粒子槍、顯微注射、可複製胞器之注射等 (Gasser and Farely, 1989)。

利用自然的抗蟲機制作成轉殖植物與化學殺蟲劑比較，其優點有：(一)避免抗藥性的快

速產生；(二)可嚴格調控抗蟲物質適地（組織）適時啟動；(三)具長時效性；(四)不會傷害非目標昆蟲，植食性害蟲除外；(五)減低誘發次級害蟲的風險；(六)增進環境保護（Boulter，1989）。

## 蘇力菌內毒素之利用

蘇力菌係在產孢時形成伴孢晶體，內含結晶毒蛋白，此殺蟲結晶蛋白經昆蟲腸道內的高鹼性及蛋白質酵素作用，於是分解成有作用的毒素。其產生殺蟲結晶毒蛋白之基因可大分 *cry I*（鱗翅目）、*cry II*（鱗翅目、雙翅目）、*cry III*（鞘翅目）、*cry IV*（雙翅目）、*cry V*（線蟲）及 *cyt* 等。

Vaeck 等人（1987）以 *Bt2* 基因帶有活性毒素的片段，進行不同之構築，轉殖入菸草，結果毒蛋白產生量高，殺蟲效果亦佳，產生量較少的，對菸草天蛾（*Manduca sexta*）幼蟲體重亦有明顯的抑低效果。Monsanto 公司的 Fischhoff 等人（1987）以 *Btk* HD-1 基因片段作刪除（deletion）工作，其活性於小於 pMON5323 完整片段以下時，即不復存在。又以 *Bt* 毒素基因接上 CaMV 35S 啟動子（promoter）作成轉殖番茄，並從事實驗室內及盆栽的殺蟲試驗，其親代子代都對菸草天蛾有良好的殺蟲效果，其次是 *Heliothis virescens*，再次是 *H. zea*。Barton 等人（1987）構築改造 *Bt* 成嵌合基因，結合農桿菌載體，轉殖入菸草（*Nicotina tabacum*）細胞分化成植物體，可以對抗菸草天蛾，其所具基因數愈多，產生的 RNA 也愈多，抑制取食和殺蟲效果也愈好，此種特性並具有遺傳效果。1990年後，這類研究更多、更深入。

利用蘇力菌的優點為：具有使用安全的悠久歷史；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（Brunke 和 Meeusen, 1991）。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，在1990年蘇力菌產物之管理策略研討會（1990 Symposia on Management Strategies for *Bacillus thuringiensis* Based Product' hosted by the Monsanto Agricultural Company），提出管理昆蟲抗藥性的可能策略如下：(一)高劑量（high dose）殺死全部的昆蟲，不讓有存活而可能產生抗性者。(二)低劑量（low dose），昆蟲並未致死但存活得不好，而增加被天敵等的攻擊機會。(三)輪替用藥（rotation），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），田間不完全栽培抗性品種，仍保留部份感蟲品種，令感蟲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。

## 蛋白酶抑制劑之利用

蛋白酶抑制劑（proteinase inhibitor），是許多植物演化而來的抗蟲機制，此種蛋白質具抗代謝之活性，對廣泛的害蟲有效。主要分成四大類：serine（anti trypsin and/or

chymotrypsin) 、thiol (cysteine) 、metallo-、aspartyl- (Brunke and Meeusen, 1991) 。

昆蟲腸道內存在有蛋白酶，但當蛋白酶被抑制時，昆蟲會因不能利用蛋白質而死亡，因此若能尋找到適當的蛋白酶抑制劑，來對付重要害蟲，取食時即可使之致死，殺蟲範圍廣，且昆蟲不易對其產生抗藥性，但所需劑量很高。另植物血球凝集素類物質，如某些昆蟲具有顯著的抑制幼蟲發育和成蟲羽化的效果，亦值得研發。

昆蟲消化道內含有不同的蛋白酶 (proteinase) ，例如科羅拉多馬鈴薯甲蟲即不受馬鈴薯中絲胺酸蛋白酶抑制劑 (serine proteinase inhibitor) 的抑制，而可以危害馬鈴薯 (Brunke and Meeusen, 1991) 。相反的，四紋豆象 (*Callosobruchus maculatus*) ，當以 E-64 cysteine 蛋白酶抑制劑製成人工種子飼養其幼蟲時，會隨 E-64 含量的增加而延長發育所需日數，顯著降低雌蟲的產卵數。因為 cysteine 蛋白酶是幼蟲中腸裡一種必需的酵素 (Murdock *et al.*, 1988) 。

黎豆 (*Vigna unguiculata*) 是西非、南美的重要豆類作物，但在倉儲後5個月內會百分之百遭受四紋豆象為害。奈及利亞國際熱帶農業研究所 (International Institute of Tropical Agriculture in Nigeria) 自數千個黎豆品種中篩選出抗該象鼻蟲的 TVu 2027 (Hilder *et al.*, 1989) 品種，其中所含的 Cowpea trypsin inhibitor (CpTI) 是短的多胜鏈 (small polypeptide-80 amino acid) ，為 Bowman-Birk 型的雙頭絲胺酸蛋白酶抑制劑，其作用在酵素的催化中心，而昆蟲不易對此機制產生抗性 (Hilder *et al.*, 1987) 。Hilder 等人 (1987) 拿此 CpTI 的 cDNA 進行不同的構築，育成轉殖菸草，其 CpTI 產量愈高者，植株表現活性也愈高，使測試的 *Heliothis virescens* 存活蟲數降低，且即使不死，取食量降低，生物量 (biomass) 也降低。CpTI 轉殖的菸草不受菸草天蛾的危害，而對照組被取食殆盡 (Hilder *et al.*, 1989) 。然而是否具 CpTI 轉殖基因，對植株外觀並不影響 (Boulter, 1989) 。

CpTI 轉殖植物或在人工飼料內對鱗翅目、鞘翅目的幾種蟲，都顯現其效果 (Hilder *et al.*, 1989) 。

Johnson 等人 (1989) 將 35S CaMV 啟動子，接到番茄 PI-I、PI-II 和馬鈴薯 PI-I 的基因上，育成兩種轉殖菸草。轉殖 trypsin inhibitor 的菸草，比轉殖 chymotrypsin inhibitor 的菸草對菸草天蛾幼蟲較有抵抗性，證明係 trypsin inhibitor 被活化。當組織產生抑制劑愈多，測試的菸草天蛾幼蟲體重也愈輕。

利用蛋白酶抑制劑當做昆蟲防治因子，優點為：(一)對付昆蟲範圍較廣；(二)當做防止蘇力菌抗性之第二機制；(三)烹煮可破壞；(四)常存在於人畜的食物中。缺點有：(一)必需很大的量才能殺死昆蟲；(二)需設法調控在特殊的植株器官上的表現 (Brunke and Meeusen, 1991) 。

## 絲胺酸蛋白酶抑制劑增強蘇力菌殺蟲活性

這兩類生物性殺蟲物質混合，是否具協力效果，因而提高殺蟲活性？MacIntosh 等人（1990）以21種豆類或糧食作物等的萃取物與蘇力菌黃粉甲蟲亞種（*Bacillus thuringiensis tenebrionis*）（*Btt*）或蘇力菌庫斯培基亞種（*Bt kurstaki*）（*Btk*）HD-77混合，結果均較單獨的 *Btt* 或 *Btk* 效果為佳。於是他們從 Sigma 藥品中取得分離自黃豆的 Kunitz（trypsin inhibitor）和 Bowman-Birk（trypsin-chymotrypsin inhibitor）兩型抑制劑，當單獨施用 Kunitz 10 $\mu$  g/ml 時，對科羅拉多甲蟲等無殺蟲效果，但若與 *Btt* 混合，可提高 *Btt* 的效果達8~40倍。當 Kunitz 或 Bowman-Birk 單獨處理 *H. virescens* 無效，若混合 *Btk* 則可大大提高 *Btk* 的殺蟲效果，並且對幼蟲體重的抑制效果增加好幾倍。所使用的抑制劑不限於來自植物，縱使是來自動物胰臟或卵黃的也都有增強 *Btk* 的殺蟲效果。但 Bowman-Birk 抑制劑並不增加全長（full length）的 HD-73和 HD-1蛋白質的效力，推測原因，可能係互相之間起了干擾作用。而處理過的（tryptic）HD-73片段為何與 Bowman-Birk 或 Kunitz 混合皆不增效，其原因仍未明。

*Btk* 與兩種抑制劑混合可增強對菸草天蛾、擬尺蠖、*H. virescens*、*H. zea* 體重的抑制效果，Kunitz 與 *Btk* 混合對 *H. zea* 可達13倍之多。將合成的南瓜胰蛋白酶抑制劑（*CMTI*）基因和 *Btk* HD-1 融合育成轉殖菸草，而此獨特的 *CMTI* 基因被放在 *Btk* 上游產生第25個胺基酸的位置前時，所產生的蛋白質被昆蟲腸內蛋白酶作用以後，自28和29個胺基酸切斷而成活化的 *Btk*，和增效的 *CMTI* 蛋白質結果於 *H. virescens* 的生物檢試上，較單獨 HD-1 對抑制幼蟲體重增加6倍的效力。

## 結 論

目前該兩類生物性殺蟲物質，以蘇力菌被研究及應用較多，已有多種商品出產，並且有生物技術改良的產品上市。單獨使用或育成含蘇力菌或蛋白酶抑制劑的轉殖植物各有其優缺點，但若二者聯合，其技術上可行性如何？實用性如何？對環境的衝擊又是如何？則有待嚐試及評估。