

外源凝集素在植物抗蟲上扮演的角色

曾經洲 高穗生

前 言

自然界中植物與昆蟲共同演化 (co-evolution) 了40億年，植物與昆蟲皆各自發展出了本身的防衛系統。人類爲了減少栽培作物的損失，利用各種方法防治害蟲，包括採用天然物來防治害蟲，而後開發出合成殺蟲劑（有機氯、有機磷、胺基甲酸鹽、合成除蟲菊等），近三十年來又有蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 上市，爲蟲害防治再添新猷，又近十年來蛋白酶抑制劑 (protease inhibitor) 之研究開發利用亦逐漸展開中，另亦發現植物所產生的外源凝集素 (lectin) 具殺蟲活性，目前之研究已進入生物化學、分子生物之層次，茲參考有關文獻，特將外源凝集素 (lectin) 之種類，及在植物上抗蟲表現，作一簡短之綜合說明。

外源凝集素之類別與作用機制

一、外源凝集素的存在與植物防禦

外源凝集素是一種碳水化合物結合蛋白 (carbohydrate-binding protein)，與醣蛋白 (glycoprotein)、醣脂質 (glycolipid) 或多醣類的聚醣 (glycan) 有很高的親和力；存在於細胞內、細胞間或組織之間；子葉的液泡內有很高的含量，但種子的胚軸內含量很低，在種子形成的時候與其他的主要蛋白質一同被合成。其在植物防禦上主要有三大功能：（一）在根毛表面可以凝結許多的細菌，而有固定某些共生細菌或防禦有害細菌之作用；（二）當動物取食種子或組織時，外源凝集素則會被嚼碎釋出，與襯在腸道表面的醣蛋白結合，而抑制營養的吸收；（三）當真菌菌絲侵入破壞植物組織結構時，會導致液泡內的外源凝集素漏出而抑制菌絲生長。一種植物中可能含有數種與結構有關，具不同的生物活性的外源凝集素蛋白質。

二、外源凝集素之類別

外源凝集素蛋白質可分成同源的兩大類，一是來自菜豆 (*Phaseolus vulgaris*) 子的植物血球凝集群 (phytohemagglutinin family, PHA) 的四成員，包括對哺乳動物及鳥類有毒的 PHA-E、PHA-L 和對象鼻蟲類有毒的 α -澱粉

包括對哺乳動物及鳥類有毒的 PHA-E、PHA-L 和對象鼻蟲類有毒的 α -澱粉酶抑制劑、arcelin，它們具有類似之蛋白質系列。另一類群則是結構上帶有幾丁質結合之功能部位 (chitin binding domain) 的小麥胚芽凝集素 (WGA)、稻米外源凝集素、薑陀羅花外源凝集素、番茄外源凝集素、水母外源凝集素、能抑制真菌的 hevein 和幾丁質酶等。

三、外源凝集素的抗蟲作用機制

昆蟲幼蟲食入後，外源凝集素與中腸皮膜細胞 (epithelial cell) 結合，以致阻礙營養的進入，並且反而使有害物質容易進入；當昆蟲取食 2% 外源凝集素後，在螢光抗體試驗下，不只在中腸皮膜細胞表面有螢光反應，在腸外的脂肪細胞 (fat cell) 亦有。當昆蟲脫皮化蛹時蛻去腸皮膜，但蛻不去脂肪細胞，因此外源凝集素之作用仍然存在蛹期。外源凝集素不與後腸結合，因其有外胚層內陷的表皮 (cuticle) 存在之故。

對四紋豆象 (*Callosobruchus maculatus*) 具有抗性之菜豆，對豆象 (*Acanthoscelides obtectus*) 卻無抗性，因為兩種豆象之蛋白質水解作用 (proteolysis) 屬於同源，所以對食物適應力之不同，並非由於外源凝集素水解程度不同的結果，而係外源凝集素不結合到豆象之皮膜細胞，或無法穿越圍食膜之故。

外源凝集素的抗蟲表現

一、抗蟲菜豆的篩選

菜豆是南美洲、中非洲重要的經濟豆類，也是該地區人們主要的蛋白質攝取源，現也已成爲熱帶及亞熱帶地區人們及動物的重要食物，但自採收後即受到鞘翅目豆象和墨西哥豆象 (*Zabrotes subfaciatus*) 嚴重的危害，但隨菜豆栽培品種或品系的不同，兩種豆象個別的爲害程度亦所有所差異，換言之，不同品種、品系內所含有的外源凝集素，對兩種豆象有不同的生物活性。

1982年 Schoonhoven and Cardon 自四千多種豆子中去研究對豆象和墨西哥豆象之抗性，設立標準測試法，觀察其子代個體數、發育時間及成蟲體重。雖抗蟲品種不易獲得，但所篩獲之種子，以其飼養五代，供試蟲仍無法克服其抗性，改以感蟲品種飼養時，供試蟲的發育則與一直在感蟲種子上生長之供試蟲無異，再重新以抗蟲品種飼養時，則生長又受抑制。然而有一種豆子 (*Phaseolus acutifolius*) 較菜豆抗豆象，當菜豆對豆象失去抵抗力時，*P. acutifolius* 豆子仍可抗之。

在一些非栽培種的菜豆上進行豆象及墨西哥豆象之抗蟲性調查，發現可使成蟲產卵減少；延長幼蟲期；減少子代體重；飼養三代後，抗蟲性仍存在；自抗蟲性品種羽化出來之成蟲，在感蟲品種上之產卵力降低；有二個品種會使測試象鼻蟲全部致死；抗性表現不僅在種子，在豆莢上也具有。

1986年人工豆子 (artificial diet) 之製作成功，在覆被 (coating) 上凝膠 (gelatin) 後，可以被象鼻蟲寄生，完成生長發育，效果較天然豆子有過之而無不及。自此此類研究有了新突破，因可任意將已知的成份加入人工豆子，而不必只是自天然豆子中去推測分析其有效成份。

二、外源凝集素不同成份間的抗蟲特性

當菜豆種子所含的植物血球凝集素 (PHA) 被加入四紋豆象之黎豆 (*Vigna unguiculata*) 飼料中時會殺死其幼蟲，但經加熱分解 PHA 後，該幼蟲反而生長較對照組好。

1984年 Gatehouse 等人，首先自菜豆中分離出白蛋白 (albumin) 層和球蛋白 (globulin) 層成份，對四紋豆象皆具有毒性，而球蛋白層效果大於白蛋白層，在以兔子紅血球進行血球凝集反應時，白蛋白層為 2^{11} /unit，球蛋白層為 2^4 /unit，但一般商品的外源凝集素效果較純化者為佳。再經 SDS-PAGE 蛋白質電泳分析，得商品級外源凝集素有 E (紅血球) 和 L (淋巴球) 結合次單位，而經純化的外源凝集素只有 L- 結合次單位，而白蛋白層則屬 L- 結合，球蛋白層屬 E- 結合，因此解釋致毒主因於 E- 型式結合之次單位。此說後來遭 Murdock 等人 (1990) 批評，稱其結果係 α -澱粉 抑制劑污染之故，因純化之 PHA 對四紋豆象無毒效。而且後來的報告中類似的試驗，卻是白蛋白層蛋白質較球蛋白層為毒，而效價 (titer) 仍以白蛋白層為高，保護外源凝集素免被蛋白質水解。

自另外一種豆子 (*Psophocarpus tetragonolobus*) 分離到白蛋白層和球蛋白層蛋白質，該二層蛋白質對四紋豆象成、幼蟲皆具毒效，且白蛋白層毒效 ($LC_{50}=25g/kg$)，大於球蛋白層 ($LC_{50}=50g/kg$)，此結果與血球凝集之情況相符。當將外源凝集素自其中純化出來後，發現對四紋豆象幼蟲之毒性更高， $LC_{50}=3.5g/kg$ ，接近生理濃度。

哥倫比亞熱帶農業研究中心 (CIAT) 執行了一連串抗蟲豆子篩選的計畫。自野生抗蟲菜豆中找出編號 G12953 之抗蟲菜豆，可造成 80-98% 豆象和墨西哥豆象幼蟲死亡率，並且幼蟲生長期延長。自 G12953 抗感性品系中分離其白蛋白層和球蛋白層蛋白質，進行豆象發育時間測試，不同部分 (fraction) 之蛋白質對供試蟲發育沒有顯著差異，但抗蟲品種皆比感蟲品種顯著影響供

試昆蟲有較長的發育時間。另抗蟲品種可溶性碳水化合物層分離出之物質加入人工飼料，隨濃度之升高有顯著的抑制成蟲羽化和幼蟲發育的效果，顯示其中異多醣類 (heteropolysaccharide) 中含有某些抗代謝物質存在，經分析得阿拉伯糖 (arabinose) 和岩藻糖 (fucose) 之含量較感蟲品種高出許多。

從成熟的 *P. acutifolius* 豆子中分離到四種產物，其中 30kD 分子量的可溶性產物，胺基酸序列與菜豆 PHA 很像，該成份以 1-5% 含量加入人工豆子中，對豆象具有毒性。

17種植物的外源凝集素加入人工豆子去測試四紋豆象之生物活性，其中五種在 1.0% (w/w) 有良好的抑制幼蟲發育效果。這些外源凝集素可劃分成對 N-acetylgalatosamin/galactose (GalNAc/Gal) 具專一性和對 N-acetylglucosamine (GlcNAc) 具專一性的兩類。其中屬於 GalNAc/Gal 類的花生外源凝集素，劑量每增加 0.1% 可致使發育時間延遲 0.49 天；屬於 GlcNAc 的小麥胚芽凝集素 (WGA) 效力更好，劑量反應為每增加 0.1% 可延遲幼蟲發育 1.47 天，而且死亡率增加 2.79%。

分離自六倍體小麥的胚芽凝集素，有三種異 (iso) 外源凝集素同源二聚物，每一種異外源凝集素均對四紋豆象有害，此三種小麥胚芽異外源凝集素的基因皆可以用於轉殖抗蟲植物；另外雖然稻米外源凝集素較小麥胚芽凝集素，對哺乳類動物紅血球的凝集活性大 4 倍，但對四紋豆象之生物活性卻是相同並未較高。

小麥胚芽凝集素對歐洲玉米螟有殺蟲之效果，但以 cyanogen bromide (CNBr) 處理，CNBr 會自小麥胚芽凝集素胺基酸序列 N 端算起第 26 與 27 之間蛋氨酸 (methionine) 處穿切斷之，以致不能形成二聚體，也就不能結合 GlcNAc，不能行紅血球凝集，無抗體反應，亦無殺歐洲玉米螟之效果。

三、Arcelin 的抗蟲研究

菜豆種子的儲存性蛋白，以 SDS-PAGE 蛋白質電泳，可分離出四種蛋白質成份 (arcelin-1,-2,-3,-4)，分子量介於主要蛋白質腰豆蛋白 (phaseolin) 和外源凝集素之間。而當豆子出現 arcelin 時，腰豆蛋白就相對減少。arcelin 主要是二聚體 (dimer) 亦有四聚體 (tetramer)，原始的蛋白質分子量為 80.9 KDa 或 159KDa。將 arcelin 與外源凝集素的主成份 PHA 作比較，兩者之間有相似的次單元 (subunit) 分子量和去醣化後的分子量等，胺基酸組成也相似，但 PHA 蛋白質是四聚體組成，而 arcelin 主要是二聚體。控制 arcelin 表現的基因與控制 PHA 表現之基因，關連性很高。arcelin cDNA 的核酸序列，自 5'

端的第三個 ATG 起，有與 PHA 基因類同之啓始密碼。然而含 arcelin-1 之人工豆子較含 PHA 者，對墨西哥豆象有顯著的抑制幼蟲發育和成蟲羽化的效果。

可以抗墨西哥豆象的豆子，所含 arcelin 是單一對不完全顯性基因型。一菜豆內若為 arc/arc 基因型，則墨西哥豆象在其上羽化率可達 76-94%，若為 Arc¹/arc 基因型，則羽化率降為 30-39%，若為 Arc¹/Arc¹ 基因型，則羽化率降至 2%。arc1、arc2 基因在 1988、1990 年已被分別選殖，分別具 948、902 核苷酸，相似程度達 99.3%，僅 6 個核苷酸不同。

自不同野生菜豆品系對偶基因 (alleles) 個別分離到 arcelin-1,-2,-3,-4,-5 成份，以感受性指數 (Index of susceptibility) 為評估標準，其對墨西哥豆象之感受性，其中含 arcelin-5 者指數為 -0.3 亦即最具抗蟲性，依次是含 arcelin-4 (指數 0.8)、arcelin-1 (指數 1.0)、arcelin-2 (指數 2.3) 者，含 arcelin-3 者指數為 7.7，屬感受性品系。

至於抗蟲機制，詳因尚未清楚，arcelin-4 在墨西哥豆象的幼蟲腸道中，不但不會被蛋白質水解，還能導致其幼蟲 α -澱粉 的活性降低，可能因而影響幼蟲對菜豆的消化，致無法利用。

展望

目前利用外源凝集素成員所含抗蟲成份進行基因轉殖成功的例子並不多，主要因為尚無顯著的效果。但比較各成員之殺蟲活性，以 Arcelin 較佳，但 arc 基因的調節基因及調節機制尚無分析報告。腰豆蛋白在真核單細胞酵母菌內可被醣基化修飾，而醣基化對 Arcelin 的抗蟲活性，有否影響仍不清楚。目前利用大腸桿菌為轉殖寄主產製 Arcelin 的策略亦應被修改，因 Arcelin 對大腸桿菌具有毒性。arc 基因來自高等植物，因此轉殖回高等植物的表現，預期會比在單細胞生物為佳，並且更具實用性，是頗值得繼續探討的課題。