

# 含蘇力菌毒素基因 *cryIAa1* 之轉形葉表生菌 *Erwinia herbicola* 的殺蟲活性與質體留存之分析

林志輝<sup>1</sup> 黃文忠<sup>1</sup> 曾經洲<sup>2</sup> 陳良築<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 台中市 國立中興大學分子生物學研究所

<sup>2</sup> 台中縣霧峰鄉 農委會農業藥物毒物試驗所生物藥劑系

(接受日期：中華民國 91 年 3 月 26 日)

## 摘 要

林志輝、黃文忠、曾經洲、陳良築\* 2002 含蘇力菌毒素基因 *cryIAa1* 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

葉表生菌 *Erwinia herbicola* 與大腸桿菌 *Escherichia coli* 同屬腸道科細菌，常見於蔬菜、果樹等植物葉面，對植物本身大多沒有毒性，同時會分泌抗生物質抑制火燒病 (fire blight) 病原菌 *Erwinia amylovora* 的生長，若將有效的抗蟲基因轉入，則可提高 *E. herbicola* 在經濟作物保護上的利用價值。我們利用菌種中心提供之 *E. herbicola* ATCC 14589，以及由芥藍菜嫩葉上篩選出本土菌株 *E. herbicola* TC1 與 TC7 作為基因轉形 (transformation) 之宿主，透過電穿孔轉形法將構築有蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis*) 基因 *cryIAa1* 的質體 pUN4 分別送入上述菌株，得到 Eh4、Eh5 與 Eh6 轉形株，並觀察 *cryIAa1* 基因所表現蛋白質的殺蟲效果。Eh4、Eh5 與 Eh6 的總蛋白質抽出物，在濃度為 2.5 mg/ml 下，餵食小菜蛾三齡幼蟲 72 小時後，幾乎可達到 100 % 的死亡率，而在低濃度 0.625 mg/ml 下，仍分別達到 80 %、94 % 與 42 % 的死亡率；其中，Eh4、Eh5 在更低蛋白濃度 0.312 mg/ml 下，仍可分別造成小菜蛾幼蟲死亡率達 26 % 與 42 %。在殺蟲時效性的觀察方面，利用濃度為 1.25 mg/ml 之轉形菌株蛋白萃取物餵食，經 48 小時後，即可分別造成 84 %、82 % 與 52 % 的小菜蛾幼蟲死亡，接近餵食半量濃度 0.625 mg/ml 在 72 小時後造成的死亡率，顯示提昇濃度可提前見效，有助於減少葉面遭受取食。另外在不含抗生素 Ampicillin (Amp) 的培養條件下，觀察質體 pUN4 在轉形的 *E. herbicola* 菌體中續存的狀況，以及調查轉形菌株在甘藍葉面上族群的穩定程度，有助於評估此基因轉形菌種在田間施用的可行性。在質體續存的探討上，在無 Amp 篩選壓力下培養 Eh4 或 Eh6，發現含 pUN4 質體的菌數會在培

\* 通訊作者。E-mail: ljchen@dragon.nchu.edu.tw

附註：林志輝與黃文忠具相同研究貢獻

養一天後開始減少，兩週內轉形菌數維持在  $10^7-10^{10}$  CFU/ml，總菌數則保持在  $10^{13}$  CFU/ml 左右，顯示轉形菌株雖會逐漸淘汰質體 pUN4，仍在一定的培養天數內，達到繁殖數量上的平衡。在葉面菌株族群穩定度的調查上，將菌數  $10^6-10^7$  CFU/ml 的 Eh4 或 Eh6 均勻噴灑在甘藍菜的葉面上，逐日採取固定面積的葉片，計算葉面殘存的轉形菌株，發現一週後仍有  $10^4$  CFU/ml，隨著時間菌數會逐漸下降，兩週後殘留的轉形菌株為  $10^2$  CFU/ml，一個月後則完全測不到轉形菌株的殘留，而不含轉形質體的對照菌株，則仍可維持  $10^4-10^5$  CFU/ml 的菌數，此顯示將轉形菌株作為生物農藥施用於田間，可因缺乏維持質體的抗生素壓力，減少菌體內殺蟲成份之殘留，並降低轉形基因污染環境之發生機率。總之，利用葉面拮抗細菌 *E. herbicola* 表現蘇力菌殺蟲蛋白，以及轉形質體逐漸淘汰的特徵，將使葉表生菌成為一項具有環境保護的生物性農藥。

(關鍵詞：葉表生菌、蘇力菌、殺蟲晶體蛋白、基因轉形、生物農藥、生物防治)

## 緒 言

由於嚴重的環境污染問題與害蟲抗藥性的產生，使得以化學農藥為主的病蟲害防治策略，逐漸改變成對生物性農藥的倚重。近年來，許多抗蟲、抗病或抗殺草劑的基因逐漸被發掘與應用；其中，蘇力菌殺蟲晶體蛋白 (insecticidal crystal proteins, ICP) 基因更是廣泛地被運用於各種生物防治的案例中<sup>(28)</sup>。蘇力菌為好氣性、革蘭氏陽性桿菌，在逆境下產孢子，並伴隨形成 ICP。菌體破裂後，孢子與 ICP 同時釋出；其中，ICP 被發現具有專一的殺蟲效果，即不同的 ICP 毒殺的對象不同，例如主要防治鱗翅目的 Cry1 系列、主要防治鱗翅目與雙翅目的 Cry2 系列、主要防治鞘翅目的 Cry3 系列，以及僅對雙翅目有效的 Cry4 系列等<sup>(13)</sup>。ICP 屬於昆蟲的內毒素 (endotoxin) 之一，經幼蟲食入後在中腸道受鹼性腸液 (pH 10.2) 與蛋白作用，遂形成原毒素 (protoxin)，再經由蛋白切去原毒素蛋白 C 端形成晶體的部分，留下 N 端毒蛋白 (toxin) 的部分與蟲腸細胞膜上的接受器 (receptor) 結合，改變腸道滲透壓及造成腸細胞穿孔，腸細胞無法維持腸道內外正常環境而崩解，於是蟲體停止進食而死亡<sup>(10)</sup>。目前已知的 ICP

基因種類有 *cryI-cry37*，以及 *cyt1-cyt2*；其中，*cryI* 系列計有 *cryIA-cryIK*，並不斷增加中<sup>(6, 7)</sup>。從分類與命名上逐漸擴增的新穎 ICP 種類顯示，蘇力菌 ICP 基因已儼然成為生物農藥發展的利器，運用這些基因進行病蟲害防治也早已成為主流。

目前運用蘇力菌 ICP 或其基因進行生物防治的常見方法是篩選強效的菌種，並將菌體直接施用於田間。另一種方式是藉由植物基因轉殖 (transgenic) 技術，將 ICP 的基因轉入植物體內，使其在植物細胞內大量表現，以獲致長效性的保護<sup>(27)</sup>；但是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。於是在現有的侷限性下，有必要另覓開發途徑，例如運用他種微生物與經濟作物相互依存的附生關係，進行抗蟲基因的轉形，可擴大蘇力菌 ICP 基因的應用層面。目前已知將 ICP 的基因轉至螢光假單孢菌 (*Pseudomonas fluorescens*)、藍細菌 (cyanobacteria) 等微生物中，仍能表現出有效的 ICP，同時也能長時間留存於自然環境中<sup>(5, 11, 17, 18)</sup>。其中，螢光假單孢菌是屬於植物正常的根群菌之一，目前已知利用轉位子 (transposable element) Tn5 將 ICP 的基因插入細菌的染色體中，可以穩定地隨著宿

主細胞分裂與表現<sup>(18)</sup>。本研究使用甘藍葉面常見的菌種 *E. herbicola* 作為蘇力菌 ICP 基因的新宿主，將 *cryIAa1* 基因送入 *E. herbicola* ATCC14589 與自行篩選的 *E. herbicola* TC1 與 TC7，測試其表現 ICP 的能力與效價。此外，作為 *cryIAa1* 基因載體的 pUN4 能否在沒有 Amp 的篩選壓力下，持續存在於 *E. herbicola* 菌體中，也是此研究之重點。總之，利用表生菌體內大量表現的蘇力菌 ICP，以及善加利用表生菌與植物葉面的附著關係，應可彌補直接施用蘇力菌體來保護葉面的不足之處。

## 材料與方法

### 菌種、基因來源與質體構築策略

菌種 *E. herbicola* ATCC 14589<sup>(9)</sup>係購自食品工業發展研究所菌種保存及研究中心(新竹市, 中華民國台灣省); *E. herbicola* TC1 與 TC7 菌種分離自台中縣大里市樹王村田間栽培之芥藍菜嫩葉。已知甘藍或芥藍菜等十字花科蔬菜有三大植物表生菌群，一是螢光假單孢菌，在 LB(1 % trypton, 0.5 % yeast extract, 1 % NaCl, 1 % agar) 培養基上，28 °C 的培養條件下，菌落呈白色圓凸型；另一則是 *E. herbicola*，在 LB 培養基上，相同的培養條件下，菌落呈黃色圓凸型。取芥藍菜嫩葉進行篩選，得到兩種菌相，再與純化的 *E. herbicola* ATCC 14589 之菌落比較型態與顏色，經過顯微鏡檢細胞形態與測定生長勢，得到 TC1 與 TC7 兩個純化菌株。

此試驗中使用之蘇力菌 ICP 基因為 *cryIAa1* (GeneBank accession no. M11250)，係來自 *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 的內生性質體 pES1，大小約 17 kb<sup>(25)</sup>。*cryIAa1* 基因位於 pES1 上的 2 個 *Nde* I 切位之間，切下後可利用 Klenow 聚合 將 *Nde* I 切位 (5'-protruding) 補平，再接入 *E. coli* 重組質體 pTZ19U (GeneBank accession no.

Y14836) 的 *Sma* I 限制 切位，並篩選出基因轉譯起始密碼 ATG 靠近 pTZ19U *lacZ* 啟動子的質體，即可得到 pUN4 質體 (圖一)。

### *E. herbicola* 轉形法

#### 勝任細胞 (competent cells) 之製備：

挑選單一菌落的 *E. herbicola* ATCC 14589 或 TC1、TC7，培養在不含洋菜膠的 LB 培養液 5 ml 中，28 °C 震盪 120 rpm 過夜。隔日取 4 ml 菌液加入新鮮的 LB 培養液 400 ml 中，繼代培養 3 hr，菌液濁度 (吸光波長 600 nm, OD<sub>600</sub>) 約在 0.6–0.8 之間。將菌液置於冰上 10 min，在 4 °C 下離心 5,000 rpm，15 min (rotor model: SS-34, centrifuge model: RC5C, Sorvall, Dupont, Newtown, CT, USA)；所得的沉澱菌體，用冰冷的去離子水 400 ml 重新懸浮，同樣依上述條件離心、懸浮，重覆 2 次，最後以 10 % 的甘油 400 μl 懸浮菌體 (菌液濃度約為  $3 \times 10^{10}$  cells/ml)。

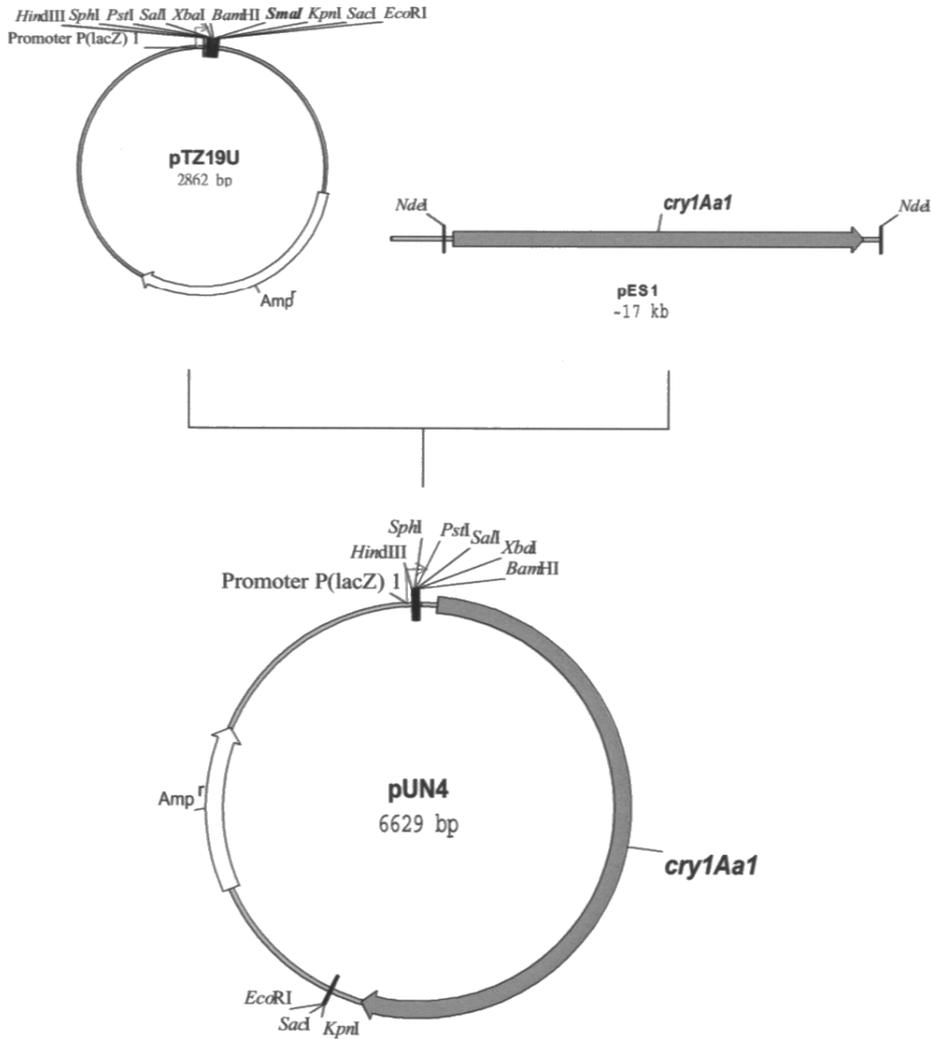
#### 電穿孔法 (electroporation)：

將 40 μl 新鮮製備的 *E. herbicola* 勝任細胞吸入預冷的電擊管 (electroporation cuvette)，均勻混入 DNA，立即將電擊管置入電脈衝器 (Gene Pulser, Bio-Rad, CA, USA) 的電極位置，電擊條件為 25 μF、2.5 KV、200 Ω、4 msec。電擊完畢，立刻加入 1 ml 的 SOC 培養液 (2 % trypton, 0.5 % yeast extract, 0.5 % NaCl)，混合均勻後移入 1.5 ml 的微離心管中，置於 37 °C 下震盪培養 1 hr。離心濃縮菌體後，將菌液塗在含有或不含 100 μg/ml Amp 的 LB 固體培養基上進行篩選。

### *E. herbicola* 總蛋白質之萃取

#### 大量萃取法：

將菌接種於 500 ml 的 LB 培養液中，28 °C 下震盪 180 rpm，培養 48 hr。離心 6,000 rpm，10 min，收取沉澱，加入 10 ml



圖一、轉形質體 pUN4 的構築。源自 *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 原生質體 pES1 (約 17 kb) 的蘇力菌殺蟲晶體蛋白基因 *cry1Aa1* 基因，經過限制 *Nde* I 切下該基因約 3.65 kb 之片段，接入 *E. coli* 重組質體 pTZ19U (2862 bp) 的 *Sma* I 切位，篩選與 *lacZ* 基因相同轉譯方向的構築，即得到 pUN4 (6629 bp)。圖中灰色區塊為 *cry1Aa1* 基因，白色區塊為抗 Amp 之  $\beta$ -lactamase 基因 (Amp<sup>r</sup>)。區塊的箭號指向轉錄方向。

Fig. 1 Construction of plasmid pUN4. An *Nde* I fragment containing *cry1Aa1* gene (3.65 kb) was isolated from pES1 (17 kb), an endogenous plasmid of *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1, and cloned into *Sma* I site of plasmid vector pTZ19U. The resulting plasmid with correct orientation concerning the direction of transcription of *lacZ* promoter was obtained, designated as pUN4. The *cry1Aa1* gene is shown as a filled box, and Amp<sup>r</sup> gene encoding  $\beta$ -lactamase is shown as an open box. The arrows indicate the direction of transcription.

的萃取緩衝液 (50 mM Tris-HCl, pH8.0, 50 mM EDTA, 15 % sucrose, 2 mg/ml lysozyme), 使其完全懸浮後, 37 °C 下搖瓶 2 hr。將樣品保持冰浴, 並以超音波細胞碎裂機 (VC500, Sonics & Materials Inc., CT, USA) 震碎菌體, 輸出功率約 237.5–332.5 Watt, 超音波週期是開啟 5 sec, 停止 1 sec, 超音波震碎時間共 2 min。以 15,000 rpm, 離心 20 min, 去除菌體碎片, 收取上清液, 即得到大量的總蛋白質。

#### 小量萃取法:

將菌接種於 5 ml 的 LB 培養液中, 28 °C 下, 180 rpm 震盪培養 28 hr。取 3 ml 菌液, 離心 12,000 rpm, 1 min, 收取菌體, 加入 150 µl 的萃取緩衝液 (50 mM Tris-HCl, pH8.0, 50 mM EDTA, 15 % sucrose, 1 mg/ml lysozyme), 使其完全懸浮後, 4 °C 下震盪 30 min。將樣品保持冰浴, 並以超音波細胞碎裂機震碎菌體, 輸出功率約 142.5 Watt, 超音波週期是開啟 1 sec, 停止 1 sec, 共 10 次。以 15,000 rpm, 離心 20 min, 去除菌體碎片, 收取上清液, 即得到小量的總蛋白質。

#### 西方墨漬法 (Western blot)

由菌體萃取出含有 ICP 的總蛋白質, 經過 10 % 的 SDS 聚丙烯醯膠體 (SDS-PAGE) 電泳後, 取下膠片, 將膠片浸泡在冰冷的轉漬緩衝溶液中 (2.5 mM Tris, 192 mM glycine, 20 % methanol, 0.05 % SDS), 30 min 後, 將膠片平舖在尺寸相同的 NC (nitrocellulose) 紙上, 上下各舖 4 張與膠片尺寸相同濾紙, NC 紙與濾紙先以轉漬緩衝溶液浸濕。形成的轉漬三明治舖放於轉漬機 (Semi-Dry Transblotter, Bio-Rad Inc., CA, USA) 的平台上, 通電 22 V, 50 min。取下轉漬完成的 NC 紙, 置於適當的浸盤中, 以 50 ml 的 TBS-milk 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1.5 % non-fat milk powder) 搖

盪浸泡 30 min, 再加入適量的抗血清, 持續搖盪 2 hr。以冰冷的 TBS 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl) 浸洗 NC 紙, 10 min, 再換新的 TBS 緩衝液, 反覆 5 次。二次抗體的結合反應, 是將已浸洗過的轉漬 NC 紙浸入 50 ml 的 TBS-milk 緩衝液, 並加入 6 µl 的山羊抗兔子之免疫球蛋白 (接有 alkaline phosphatase, Pierce Inc., IL, USA), 室溫下持續搖盪 2 hr, 再以新的 TBS 緩衝液, 反覆 5 次浸洗。呈色時, 將浸洗過的 NC 紙浸入 20 ml 的 APB 溶液中 (10 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>), 依序加入 132 µl 的 NBT (5 % nitro-blue tetrazolium chloride in 70 % dimethylformamide) 與 64 µl 的 BCIP (5 % 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate *p*-toluidine salt in 100 % dimethylformamide), 約 3 min 後即可見 ICP 的呈色訊號。

#### 生物檢定

取三齡的小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 幼蟲進行生物檢定。萃取含有 ICP 的總蛋白質, 先經過 BCA 蛋白測定試劑 (Pierce Inc., IL, USA) 測定蛋白質含量, 並調整成不同試驗濃度。取 20 cm<sup>2</sup> 圓形甘藍葉片, 置於直徑 9 cm 的培養皿中, 放在噴藥塔下 (Potter spray tower, Burkard Manufacturing Co., Hertfordshire, England), 樣品以 1 ml/5 psi 的噴量, 各噴灑葉片的兩面, 對照組以蒸餾水噴灑。葉片陰乾後, 每片葉接入 10 隻小菜蛾幼蟲, 置於 25 °C, 75 % RH, D:L = 12:12 之恆溫箱中, 24 hr 後觀察記錄死亡數, 測量葉面積, 並更換新葉片, 於處理後 48、72 hr, 分別再觀察記錄及更換新葉片。各樣品均 5 重覆, 以便計算平均死亡率與取食後平均殘留葉面之百分比。

#### 質體 pUN4 在 *E. herbicola* 菌體中的穩定性測試

將帶有質體 pUN4 的 *E. herbicola*

(Eh4 或 Eh6) 培養於含有 100  $\mu\text{g/ml}$  Amp 的 LB 培養液 5 ml 中，培養隔夜後，吸取 50  $\mu\text{l}$  的菌液進行梯度序列稀釋，並塗抹於含有或不含 Amp 的 LB 固體培養基上，計算菌落形成的 CFU 值 (colony forming unit)，作為培養初始菌數值 (CFU<sub>0</sub>)，同時也吸取 50  $\mu\text{l}$  的菌液，於不含 Amp 的 LB 培養液中，進行繼代培養，取出 50  $\mu\text{l}$  的菌液進行梯度序列稀釋，塗抹於含有與不含 Amp 的 LB 固體培養基上，計算 CFU 值，連續執行 2 週。3 個重覆試驗，每隔 24 hr 各取樣 1 次。質體穩定度係依據抗 Amp 菌落在總族群中減少或留存之比例進行量化。重覆試驗所得之數據經求取平均值後，以最小平方方法求取標準差。

#### *E. herbicola* 轉形菌株在甘藍葉面族群穩定性測試

將帶有質體 pUN4 的 *E. herbicola* (Eh4 或 Eh6) 培養於含有 100  $\mu\text{g/ml}$  Amp 的 LB 培養液 50 ml 中，直到菌液濁度 (OD<sub>600</sub>) 在 0.6–0.8 之間。將菌體離心後，以 15 ml 的 0.001 % Tween 20 懸浮之。將菌液均勻噴灑於甘藍葉面，2 hr 後取 1  $\text{cm}^2$  葉片置入含有 Amp 的 LB 培養液中，並進行梯度序列稀釋，塗抹於含有 Amp 的 LB 固體培養基上，計算培養 CFU<sub>0</sub> 值。菌液噴灑於葉面後，將甘藍盆栽置於 28 °C 的生長箱中 (75 % RH, D:L = 12:12)，第 1、4、7、10、13、18、23、28、33 日，依上述取樣方式，取固定面積葉片進行殘存 CFU 值的計算。另外，也使用不帶有質體 pUN4 的 *E. herbicola* ATCC 14589 (Eh1) 或 TC7 (Eh3) 噴灑葉面，於上述相同之時間點採樣，並塗抹在不含 Amp 的 LB 固體培養基，計算殘存 CFU 值，作為 *E. herbicola* 在葉表上自然生長的對照組。實驗組與對照組在每個時間點均取樣 3 重覆。轉形菌株的族群穩定性係依據抗 Amp 菌落在葉面上存留的天數，進行量化評

估。重覆試驗所得之數據經求取平均值後，以最小平方方法求取標準差。

## 結 果

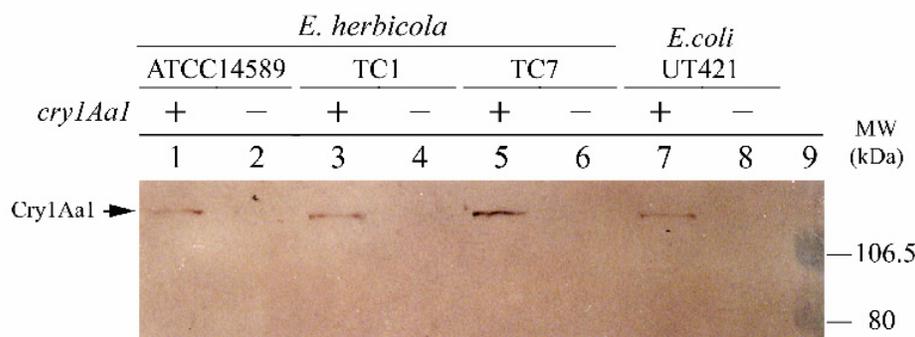
在 *E. herbicola* 中複製含蘇丹菌 *cry1Aa1* 基因之 *E. coli* 質體

使用 *Nde* I 限制 切斷含 *cry1Aa1* 基因之 *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 的質體 pES1，回收約 3.8 kb 的 DNA 片段，再以 *Klenow* 聚合 補平片段的兩端，接入 *E. coli* 重組質體 pTZ19U 的 *Sma* I 限制 切位，篩選出基因轉譯起始密碼 ATG 靠近 pTZ19U *lacZ* 啟動子的質體，得到 pUN4 質體 (圖一)。再以 *E. coli* 的基因重組系統操作，送入 *E. coli* UT421 宿主。經過電穿孔法的轉形試驗，將 *E. coli* 的質體 pUN4 送入 *E. herbicola*。抽取轉形後 *E. herbicola* 的質體 DNA，並以限制 確認 pUN4 可以在 *E. herbicola* 菌體中複製。未轉形的 *E. herbicola* 則無法萃取出質體 DNA。

在 *E. herbicola* 菌體中大量表現 *Cry1Aa1* 蛋白 殺蟲活性測試

為了瞭解構築在 *E. coli* 質體上的基因是否可以在 *E. herbicola* 中表現，本試驗利用西方墨漬法測試蛋白質之表現，圖二顯示質體 pUN4 上的 *cry1Aa1* 基因，在 *lacZ* 啟動子與核糖體結合位置 (ribosomal binding site, RBS) 協助下，可在大腸桿菌 *E. coli* 或是 *E. herbicola* 菌體中表現一個分子量大小約 130 kDa 的殺蟲晶體蛋白 *Cry1Aa1*；未經轉形的 *E. coli* 或是 *E. herbicola* 菌皆無法測得 *Cry1Aa1*。由此西方墨漬法可知，轉形的 *E. herbicola* 表現的殺蟲晶體蛋白與 *E. coli* 表現的殺蟲晶體蛋白具有相同分子量大小、相同抗原-抗體反應的特性。

轉形前後的 *E. herbicola* 經測試殺蟲效果顯示，未經轉形的菌株 *E. herbicola* ATCC14589 (Eh1)、TC1 (Eh2)、TC7 (Eh3)



圖二、西方墨漬法檢測不同 *E. herbicola* 轉形株中 Cry1Aa1 蛋白質的表現。使用三種 *E. herbicola* 宿主菌株 (strain)，分別為 ATCC14589 (Eh1, lane 2) 與台灣本土分離的 TC1 (Eh2, lane 4) 與 TC7 (Eh3, lane 6)。轉入帶有蘇力菌基因 *cryIAa1* (標有+) 的質體 pUN4，分別為 Eh4 (lane 1)、Eh5 (lane 3)、Eh6 (lane 5)。箭頭所指為可測得之 Cry1Aa1 蛋白質產物，分子量約為 130 kDa。已知含有 pUN4 的 *E. coli* UT421 可表現 Cry1Aa1 蛋白 (lane 7)，與不含 pUN4 之 *E. coli* 作為對照組 (lane 8)。圖中之 lane 9 為預染之蛋白質分子量標誌，用以測量分子量大小。

Fig. 2 Western blot assay for Cry1Aa1 expression of *E. herbicola* transformed with pUN4. Equal amount of protein extracts from *E. herbicola* ATCC 14589 (lanes 1 and 2), two locally isolates TC1 (lanes 3 and 4) and TC7 (lanes 5 and 6), and an *E. coli* strain (lanes 7 and 8) were subjected to SDS-PAGE and analyzed with antibody against Cry1Aa1. Protein samples from non-transformed strains (-), Eh1, Eh2, Eh3, and *E. coli* UT421, used as the negative control, are shown in lanes 2, 4, 6, 8, respectively. Protein samples from transformed strains (+), Eh4, Eh5, Eh6, and *E. coli* UT421 with pUN4 are indicated in lanes 1, 3, 5, 7, respectively. The arrow indicates the position of Cry1Aa1 with an apparent molecular mass of 130 kDa. A prestained molecular weight marker is shown in lane 9.

略有殺蟲效果，小菜蛾死亡率約 1.8–11.3 %，經過轉入帶有 *cryIAa1* 基因的質體 pUN4 之後，轉形菌株 Eh4、Eh5、Eh6 致死的效果可達 92.2–100 % (表一)；其中，同樣對小菜蛾幼蟲的死亡率達 92.2 %，菌種中心購得菌株 (ATCC14589) 的轉形株 Eh4，需要 9.24 mg/ml 的總蛋白量，而本土篩選菌株 (TC7) 的轉形株 Eh6 僅需要 5.88 mg/ml 的總蛋白量，小菜蛾幼蟲取食的葉面積殘留率，則皆為 67 % 左右，由殘存葉面積可顯示取食少量即可造成大量死亡，以確認該項殺蟲效果 (表一)。

在表現量與相對活性的分析顯示 (表二)，轉形的 *E. herbicola* 總蛋白量達 2.5 mg/ml 時，即可造成三齡小菜蛾約 94–100 %

的死亡率；總蛋白量減半為 1.25 mg/ml 時，死亡率約在 64–96 %；再減半量至 0.625 mg/ml 時，則尚有 42–94 % 的死亡率，所測試最低總蛋白質含量為 0.312 mg/ml 時，轉形之 *E. herbicola* (Eh5) 仍能使小菜蛾達 42 % 的死亡率。本試驗亦與 *E. coli* 菌體內表現 *cryIAa1* 基因的殺蟲效果作比較<sup>(1)</sup>，結果指出含有質體 pUN4 的 *E. coli* UT421 菌株，在最低測試總蛋白質含量 0.312 mg/ml 時，對小菜蛾的致死率達 80 %，約是 *E. herbicola* 致死率 (42 %) 的兩倍。有可能是菌種間基因表現之差異，造成 *cryIAa1* 基因在 *E. herbicola* 的表現量略遜於在 *E. coli* 中的表現。

為了探討殺蟲作用的時效性，將轉形的 *E. herbicola* 菌體內所表現的殺蟲晶體蛋白，

表一、基因轉形的 *E. herbicola* 對小菜蛾之殺蟲活性<sup>1)</sup>Table 1. Insecticidal activities of the transformed *E. herbicola* strains against diamond back moth (*Plutella xylostella*)<sup>1)</sup>.

Strains	Mortality <sup>2)</sup>	Concentration of protein	Remaining
	(%)	(mg/ml)	leaf area <sup>3)</sup> (%)
Eh1/ ATCC 14589	1.8	4.35	55.5
Eh2/ TC1	5.0	6.18	55.5
Eh3/ TC7	11.3	7.17	66.0
Eh4/ pUN4/ ATCC14589	92.2	9.24	67.0
Eh5/ pUN4/ TC1	100	10.54	71.5
Eh6/ pUN4/ TC7	92.2	5.88	67.5
H <sub>2</sub> O	0	0	45.8

<sup>1)</sup> Data collected after 72 hours of treatment.<sup>2)</sup> Ten or twelve 3rd instar larvae were assayed per treatment, each data point represents the average of five replicates.<sup>3)</sup> The original leaf area is 20 cm<sup>2</sup>.表二、基因轉形的 *E. herbicola* 總蛋白質中具有小菜蛾殺蟲活性之劑量<sup>1)</sup>Table 2. Protein dosages effect on insecticidal activities against diamond back moth (*Plutella xylostella*) for transformed *E. herbicola* strains that expressed ICP<sup>1)</sup>

Recombinant strains	Mortality (%) <sup>2)</sup>				
	Concentration of protein (mg/ml)				
	5	2.5	1.25	0.625	0.3125
Eh4	100	96	96	80	26
Eh5	100	100	90	94	42
Eh6	100	94	64	42	6
H <sub>2</sub> O	0	0	0	0	0

<sup>1)</sup> Data collected after 72 hours of treatment.<sup>2)</sup> Fifty 3rd instar larvae were assayed per protein concentration for each recombinant strain.表三、基因轉形的 *E. herbicola* 定量總蛋白質對小菜蛾殺蟲活性與時間之關係<sup>1)</sup>Table 3. Time course effect on insecticidal activities against diamond back moth (*Plutella xylostella*) for transformed *E. herbicola* strains<sup>1)</sup>

Time (hours)	Mortality (%) <sup>2)</sup>		
	Recombinant strains		
	Eh4	Eh5	Eh6
24	2	2	2
48	84	82	52
72	96	90	64

<sup>1)</sup> The protein concentration used for each treatment is 1.25 mg/ml.<sup>2)</sup> Fifty 3rd instar larvae were assayed per treatment for each recombinant strain.

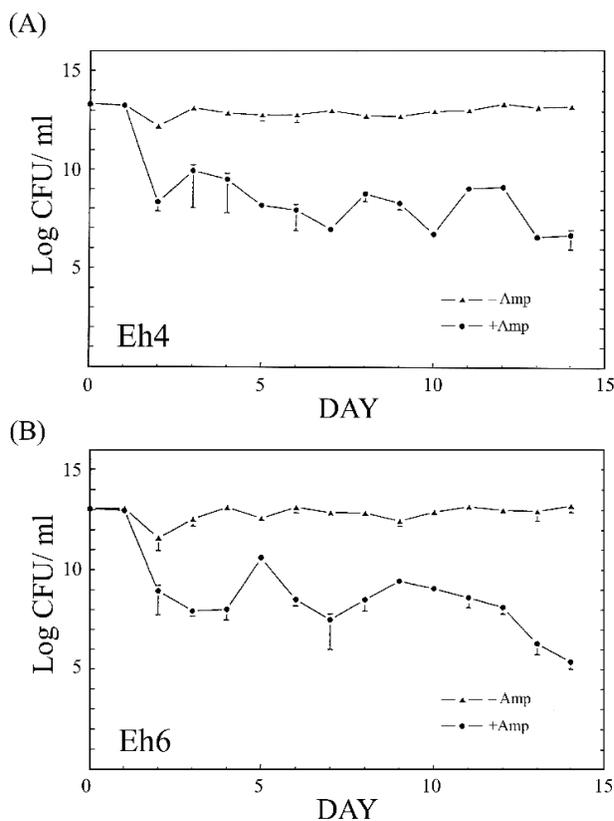
以固定濃度 (1.25 mg/ml) 的總蛋白質含量  
 餵食小菜蛾 24 小時後，分別在 24、48、72

小時後觀察小菜蛾死亡率。結果顯示在 24  
 - 48 小時之間，殺蟲效果由 2% 快速上升至

52—84 %，72 小時後，Eh4 與 Eh5 可達 90 % 以上（表三）。由此顯示，小菜蛾食用含轉形基因的蛋白樣品後，即可在 48 小時內發生明顯的中毒現象。

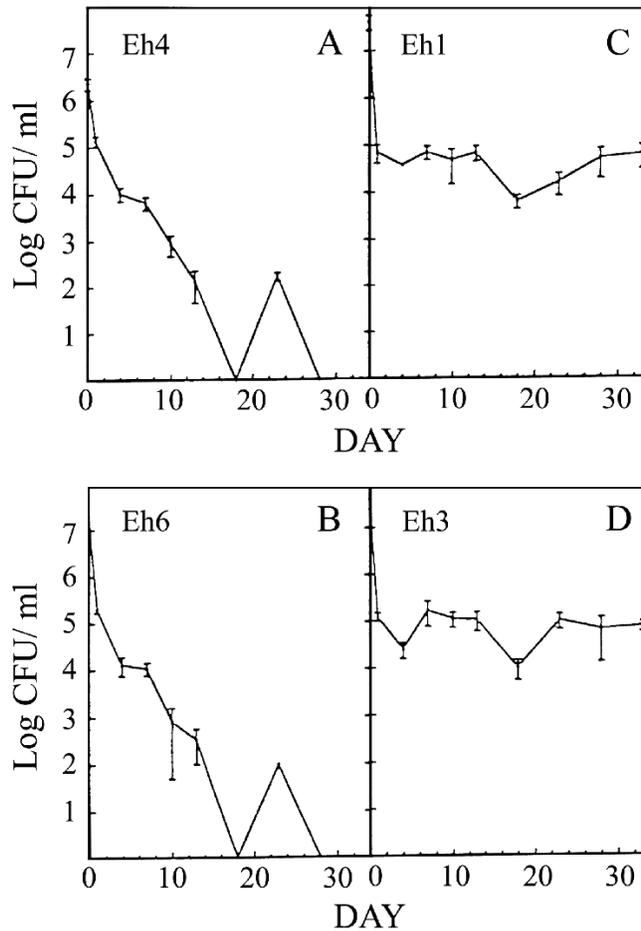
**質體 pUN4 在 *E. herbicola* 菌體中的穩定性**  
爲了觀察帶有抗抗生素基因的質體能

否在菌體中持續穩定存在，我們測試 pUN4 在不含抗生素的環境下在菌體中的存活時間。挑選 Eh4 或 Eh6 的單一菌落，先在含 Amp 的培養液中隔夜培養，再轉換至不含 Amp 的 LB 培養液中，每日繼代培養，並定時採樣，塗抹在含有與不含 Amp 的 LB 固態培養基上，測量菌數，並連續操作 14



圖三、測試含蘇力菌基因 *cryIAa1* 之 *E. coli* 重組質體 pUN4 在無抗生素篩選之下，留存於 *E. herbicola* 菌體內之分析。對培養在不含 Amp 培養液中之轉形菌株 Eh4 (A) 與 Eh6 (B)，每日分別取樣，進行序列稀釋，分別塗抹於含有 (+Amp) 或不含 (-Amp) Amp 之 LB 固體培養基上，計算菌落數，每日三重覆處理，試驗天數為 14 天，計算之菌落數以每毫升菌落形成單位 (CFU) 之對數值表示。圖中各點標示為平均值與標準差。

Fig. 3. Plasmid pUN4 retention analysis of transformed *E. herbicola* in culture without antibiotic selection. Two transformed *E. herbicola* strains Eh4 (A) and Eh6 (B) were subcultured daily for 14 days in the media without ampicillin (Amp). Samples collected daily were in series dilutions and then plated on LB media with ampicillin (+Amp) and without ampicillin (-Amp), respectively. The number of colony on plates was calculated and expressed as logCFU/ml. Each data point is the average of three repeats and its standard error is also shown.



圖四、含 pUN4 質體之 *E. herbicola* 轉形菌株在甘藍葉面上之表生菌群留存能力分析。轉形菌株 Eh4 (A) 與 Eh6 (B)，以及未轉形菌株 Eh1 (C) 與 Eh3 (D) 的菌液分別進行葉面的噴灑後，分別在 0 (2 小時)、1、4、7、10、13、18、23、28、33 天後，剪取 1 cm<sup>2</sup> 的葉面，洗下葉面之菌體經序列稀釋，塗抹在含有 Amp (Eh4 和 Eh6) 或不含 Amp (Eh1 和 Eh3) 的 LB 培養基，計算之菌落數以每毫升菌落形成單位 (CFU) 之對數值表示。圖中各點標示為平均值與標準差。

Fig. 4. Colonization of the transformed *E. herbicola* strains on cabbage leaf. Two transformed *E. herbicola* strains Eh4 (A) and Eh6 (B) and two non-transformed strains Eh1 (C) and Eh3 (D) were used to spray on cabbage leaf surface, respectively. A leaf disc with 1 cm<sup>2</sup> area from the sprayed leaf was collected after 2 hr (as the starting control), 1, 4, 7, 10, 13, 18, 23, 28, and 33 days. Bacteria washed through the leaf disc were in series dilution and plated on the LB media with ampicillin for Eh4 and Eh6, or on media without ampicillin for Eh1 and Eh3. The number of colony on plates was calculated and expressed as logCFU/ml. Each data point is the average of three repeats and its standard error is also shown.

天。由圖三中顯示，帶有 pUN4 質體的 Eh4 與 Eh6 在菌落繼代培養 1 天後 (圖三 A、B

之第 0 天)，菌數約是 10<sup>13</sup> CFU/ml。轉換至不含 Amp 的 LB 培養液中繼代培養 1 天後

(第 1 天), 菌數仍維持在  $10^{13}$  CFU/ml; 但自第 2 天起, 含有 pUN4 質體的菌數便下降到  $10^8 - 10^9$  CFU/ml, 此時總菌數略有下降 ( $10^{11} - 10^{12}$  CFU/ml), 隨後又回升為  $10^{13}$  CFU/ml 左右, 轉形菌數約佔總菌數的萬分之一。第 3 - 14 天之間, 總菌數大約維持在  $10^{13}$  CFU/ml 不變, 而轉形菌數與總菌數之差異約保持在  $10^3 - 10^6$  CFU/ml 之間, 即經過每日的繼代培養與定時採樣, 轉形菌株在總菌數的含量上保持在千分之一 ( $10^{-3}$ ) 到百萬分之一 ( $10^{-6}$ ) 之間。其中, 殺菌效果較差的轉形菌株 Eh6, 在連續繼代培養 10 天之後, 菌數有明顯下降的趨勢 (圖三 B)。

#### 含 pUN4 之 *E. herbicola* 菌株在甘藍菜葉上的族群遞減效果

爲了觀察此基因轉形產物在作物葉表存活的穩定性, 以及建立田間試驗的前導數據, 將轉形的 *E. herbicola* (Eh4 或 Eh6) 均勻噴灑在甘藍菜葉片上, 甘藍菜盆栽持續栽培於 28 °C 生長箱中, 並檢查 33 天內, 殘餘在葉面上且具有抗 Amp 的菌數。噴灑葉面後 2 小時的測定, 作為處理組的轉形 *E. herbicola*, 經過平板計數(使用含抗生素 Amp 的 LB 固態培養基)的結果, 菌數約在  $10^6$  CFU/ml 以上; 7 天內菌數仍維持約  $10^4$  CFU/ml 以上, 第 10 天則僅存約  $10^3$  CFU/ml 左右, 兩週後約為  $10^2$  CFU/ml 左右, 隨著時間愈久, 菌數也逐漸下降, 1 個月後幾乎測不到轉形菌株 Eh4 或 Eh6 的存在 (圖四 A、B)。使用未經轉形的 *E. herbicola* (Eh1 或 Eh3) 作為對照組, 經過平板計數(使用不含抗生素 Amp 的 LB 固態培養基)後, 顯示噴灑葉面 1 天以後, 表生菌 *E. herbicola* 族群便進入穩定階段, 菌數在 1 個月內維持在  $10^4 - 10^5$  CFU/ml 之間 (圖四 C、D), 不似帶有 pUN4 質體的 *E. herbicola* 會隨時間而逐漸消失。由對照組 Eh1 或 Eh3 族群的穩定性研判, 噴灑在葉面上的 Eh4 或 Eh6, 其族群減少應為質體 pUN4 丟失之故。

## 討 論

蘇力菌是廣泛使用的生物性農藥, 然而菌體防治效果的侷限性與近二十年來分子生物技術的許多突破, 促成 ICP 基因的修改與轉基因作物的出現<sup>(19, 20, 27)</sup>。雖然, 轉基因植物能突破防治效果的侷限性, 卻造成“基因改造生物”(genetically-modified organism, GMO) 在環境衝擊效應<sup>(21, 23)</sup>、害蟲抗性誘發<sup>(16, 29)</sup>與作物食用之經濟價值<sup>(8)</sup>等方面, 遭受許多爭議與抵制。明顯地, 在植物保護與經濟價值的雙贏考量下, 有必要將防治策略重新架構在生態平衡的綠色觀點上。本試驗研究即朝向此一觀點, 開發蘇力菌 ICP 基因的新應用價值。

上述實驗中使用的菌種 *E. herbicola* 又稱為 *Pantoea agglomerans*, 是植物葉面上常見的菌種之一。該菌株於 10 °C 至 40 °C 的溫度範圍內皆可生長, 最適合的生長溫度為 35 °C 左右; 生長的 pH 值範圍為 pH 5 - pH 9, 最適合生長的 pH 值則是 pH 7<sup>(2)</sup>。有彈性的生長溫度與酸鹼值, 使其能在田間自然環境的變化下持續存活。部分 *E. herbicola* 菌株還可以產生抗生素抑制其他細菌或真菌的生長<sup>(4, 14, 30)</sup>; 例如 *E. herbicola* 菌株 Eh318 會產生抗生素 pantocin A 和 pantocin B, 抑制引起火燒病病原菌 *E. amylovora* 的生長<sup>(30)</sup>; 也有報告指出 *E. herbicola* 會產生毒素抑制稻熱病的真菌病原 *Pyricularia oryzae* 之生長<sup>(4)</sup>。在台灣地區曾調查過的植物葉表面黃色細菌 *E. herbicola* 菌株不會對植物產生過敏性反應、不會引起軟腐, 其中大部分對常見的植物葉部病原菌具有拮抗作用, 例如減少甜椒細菌性斑點病之發生<sup>(3)</sup>。由此可知, 如果將 *E. herbicola* 作為蘇力菌 ICP 基因的新宿主, 則 *E. herbicola* 除了原有的病害防治效果外, 另將加入蟲害防治效果, 使病、蟲害防治得以同時兼顧。

由於 *Erwinia* 與大腸桿菌 *Escherichia*

同屬於腸道科細菌，質體 DNA 的遺傳機制方面應有相似性。*E. coli* (*recA*<sup>-</sup>) 作為宿主細菌的基因重組技術早已成熟，若將 *E. coli* 的質體 DNA 轉入 *Erwinia* 菌株，進而導入外來基因，則可提升此種葉表生菌株在農業及其他方面的應用。已知有效的 *Erwinia* 轉形技術有數種，分別在不同的 *Erwinia* 菌種上有成功的經驗<sup>(12, 15, 24, 26)</sup>；例如，利用熱休克 (heat shocking) 法，將 *E. coli* 低副本數 (low copy number) 的質體 pBR322 等，送入經過氯化鈣、氯化鎂或氯化錳處理過的 *E. herbicola*<sup>(15)</sup>、*E. chrysanthemi*<sup>(24)</sup> 與 *E. carotovora*<sup>(12)</sup>；利用粒子轟擊法 (particle bombardment) 將 *E. coli* 質體 DNA 送入 *E. amylovora*<sup>(26)</sup>。本試驗中，採用電穿孔法將 *E. coli* 質體 pUN4 送入 *E. herbicola* 菌體中，一樣可得轉形株，既不需要氯化鹽類先處理細菌宿主，又不需昂貴的基因槍設備，比上述之兩種方法方便又有效。同時，我們亦證明 *E. herbicola* 菌體中的 DNA 複製系統可以辨識屬於 *E. coli* 高副本數 (high copy number) 的質體的複製起點 *ori*，此特性對於利用表生菌 *E. herbicola* 作為宿主，進行外來基因的大量表現，具有相當大的幫助。

本轉形試驗中，使用的質體 pUN4 是以高副本數的 *E. coli* 質體 pTZ19U 作為載體，承接長度約為 3.65 kb 的蘇力菌 *cryIAa1* 基因，並以 *lacZ* 啟動子與 Shine-Dalgarno 序列作為轉錄與轉譯的訊號。*cryIAa1* 基因在 *E. coli* 的表現已經過測試，其 ICP 具有良好的殺蟲效果<sup>(1)</sup>。轉形過程是以電穿孔法將質體 pUN4 送入 *E. herbicola* ATCC14589 與自行篩選的 *E. herbicola* TC1 與 TC7，經過抗生素 Amp 的篩選與抽取質體的限制 檢驗證明，同屬於腸道科細菌的 *E. herbicola* 能夠利用 pUN4 質體上來自 *E. coli* 的複製起點 *ori*，使 pUN4 維持在菌體內，由圖二所示的西方墨漬法反應證明，在 *E. herbicola* 中的 *cryIAa1* 能表現出與 *E. coli* 相同分子量的

ICP。即便如此，轉入不同來源的 *E. herbicola* 菌株，得到的 ICP 的殺蟲效價之穩定性亦不至全然相同，由表一的小菜蛾幼蟲死亡率皆為 92.2 % 的轉形菌株 Eh4 與 Eh6 兩者比較，似乎顯示 Eh6 的效價較高，即在 5.88 mg/ml 的總蛋白質濃度即可得到高死亡率，Eh4 則需要 9.24 mg/ml；然而，由表二知，含 Cry1Aa1 的總蛋白質之殺蟲效價飽和濃度約在 2.5 mg/ml 左右，當濃度逐漸減半時，Eh4 的殺蟲活力較穩定，而 Eh6 則下降較快，有可能是因為 Eh6 中之 Cry1Aa1 蛋白質不穩定所致，惟須進一步探討。

詳查表二中，有關總蛋白質濃度半量遞減的殺蟲活性測定顯示，*E. herbicola* 所表現的 ICP 對小菜蛾具有 100 % 致死率的劑量濃度 (5 mg/ml)，約是 *E. coli* 表現 ICP 致死劑量 (1.25 mg/ml) 的 4 倍；或者，在測試最低總蛋白質含量 0.312 mg/ml 時，發現含有質體 pUN4 的 *E. coli* UT421 菌株對小菜蛾的致死率達 80 %，約是 *E. herbicola* 致死率的兩倍。推測可能是因為 *E. herbicola* 與 *E. coli* 在基因表現效率與調節上的差異，例如轉錄或轉譯的調控，或是受到 mRNA 的穩定性之影響，造成 *cryIAa1* 基因的表現在 *E. herbicola* 略遜於在 *E. coli* 中的表現，但已使 *E. herbicola* 具有抗蟲之效果。此外，測試殺蟲的時效性也是重要的試驗之一。由表三可知，轉形後的 *E. herbicola* (Eh4, Eh5) 所表現的 ICP，可以在 48 小時後，造成 80 % 以上的小菜蛾死亡率，此結果除了作為試驗生物防治時效性的參考指標，另一方面顯示，若將轉形 *cryIAa1* 基因的 *E. herbicola* 作為生物農藥，則在施用後的速效方面，應可達到快速保護作物之目的，在應用上亦具有顯著的價值。

除了速效之外，長效測試也是決定利用此一表生菌作為新型生物農藥的關鍵之一。若轉形的質體 DNA 在無抗生素輔助的篩選優勢下，仍能在一定時間內留存於菌

體中，或者是轉形菌株即使在無抗生素輔助的篩選優勢下，仍能在蔬菜葉面上留存達數週長的時間，則能降低此生物農藥的施用次數，提高農民使用之意願，或者補強直接施用蘇力菌所產生效期不長（約 3 天左右）的缺點。另一方面，長效與低殘毒對植物保護與經濟價值同樣重要，需要平衡發展。若進一步分析轉形菌株隨田間環境自然汰選或降解的狀況，將可佐證轉形的 *E. herbicola* 菌株族群降解是否符合農產品農藥殘毒安全性的需求。

對於希望利用遺傳工程細菌達到植物保護之目的而言，在沒有抗生素的農業生態環境中，能否使得帶有抗 Amp 基因的質體在菌體中持續穩定存在，將會嚴重地影響質體基因工程策略的成功與否。在傳統的細菌培養中，使用 *E. coli* 系統的質體 pUN4，其上帶有抗 Amp 的基因，在抗生素篩選壓力下，在菌體中的 pUN4 可以大量的複製，使質體上的基因有機會大量表現；上述研究結果證明，pUN4 上的 *cryIAa1* 基因可在 *E. herbicola* 菌體中大量表現。但是，一旦缺乏抗生素的篩選壓力，質體是否會在細菌的複製、分裂中逐漸消失；因此，針對質體能否發揮長效功能的疑問，我們首先測試了轉形菌體內的質體 pUN4 在不含抗生素 Amp 的環境下存活時間的長短。在圖三的試驗中，能在含有 Amp 的 LB 培養基上長出的，是含 pUN4 的 *E. herbicola*，在不含 Amp 的 LB 培養基長出的，則包含帶有 pUN4 的 *E. herbicola* 以及丟失質體的 *E. herbicola*。結果顯示，質體 pUN4 能在沒有抗生素 Amp 的篩選維持下，存在於 *E. herbicola* 菌體中，並持續數週之久。從圖三中進一步知道，在 LB 培養基的液態培養條件下，2 週內仍保有質體 pUN4 的轉形菌數（即仍具抗 Amp 的特性）比例約佔總菌數的千分之一（ $10^{-3}$ ）到百萬分之一（ $10^{-6}$ ）之間；此外，我們也測試了噴灑在甘藍菜葉面上的轉形菌株，在不含抗生素 Amp 的農藝環境下存

活時間的長短。

將蘇力菌殺蟲晶體蛋白基因轉入葉表生菌 *E. herbicola* 的目的，自然是希望表生菌本身除了具備拮抗病害微生物的本質外，能經過人工方式提高其生物防治的應用價值。從上述結果顯示，轉形基因 *cryIAa1* 所表現的蛋白具有殺蟲的活性，同時，由圖三所顯示，含有轉形基因的質體 pUN4 在毫無抗生素篩選壓力下，能在菌體中維持至少 2 週。另一方面，含 pUN4 質體的轉形細菌在作物上能維持的時間，也是重要的長效性測試之一。從圖四中得知，直接噴灑葉面後，葉面上殘留的轉形菌數會在 2 週內，由  $10^6 - 10^7$  CFU/ml 降至  $10^2$  CFU/ml，相較之下，未轉殖的 Eh1 或 Eh3，則能在葉面上保持細菌數量約  $10^5$  CFU/ml 的族群穩定性。圖四中同時顯示，至少在 18 天內，葉面上仍存有轉形菌株。依據上述菌株族群衰減狀況，可進一步評估噴灑轉形菌株於葉面上，能否在 1-2 週內維持有效的生物農藥的殺蟲效價。

綜合圖四與表二的結果，顯示促使蘇力菌 *cryIAa1* 基因大量表現於 *E. herbicola* 菌體內，使得在低量的總蛋白質下，即可造成高死亡率，如此可彌補葉面上逐漸遞減的轉形菌株族群，使此生物農藥的效價維持較久的時間。至於如何能提昇蘇力菌基因在 *E. herbicola* 菌體內之表現量，可由改善基因轉錄或轉譯的條件著手，例如用效率更高的啟動子取代 *lacZ* 的啟動子，或是利用一段新的核醣體結合位置 g10-L 序列，來提昇轉譯蛋白質的效率<sup>(30)</sup>；此種 g10-L 序列可以改善 *E. coli* 基因的轉譯效能，對於假單孢菌 (*Pseudomonas*) 基因之表現，更能提昇 38-70 倍左右<sup>(22)</sup>。在田間實施施用轉形 *E. herbicola* 菌體的防蟲效價方面，則有待進一步的測試與評估。

總之，利用 *E. herbicola* 表生菌體內大量表現的蘇力菌 ICP，以及善加利用表生菌與植物葉面的附著關係，應可彌補直接

施用蘇力菌體來保護作物葉面的不足之處。同時，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 ICP 基因，取代本試驗中所使用的 *cryIAa1*，或者將數個基因共同表現於單一 *E. herbicola* 菌體中，以達成生物農藥速效、長效、廣效之目標。

## 謝 辭

承蒙 行政院農業委員會經費補助，以及國立中興大學分子生物學研究所曾義雄教授提供質體 pES1，陳鵬文博士協助質體 pUN4 之構築，謹此誌謝。

## 引 用 文 獻

1. 陳鵬文。1992。蘇力菌殺蟲晶體蛋白基因之分離及應用。國立中興大學分子生物學研究所碩士論文。80 頁。
2. 陳麒仲。2001。菌體外冰核物質生產菌之篩選。國立中興大學食品科學研究所碩士論文。121 頁。
3. 曾素真。2001。台灣植物葉表 *Pantoea agglomerans* 及其他黃色細菌之鑑定與特性。國立中興大學植物病理學研究所碩士論文。37 頁。
4. Adetuyi, F. C. 1990. Studies of the antifungal compounds produced by *Erwinia herbicola*. Indian J. Pathol. Microbiol. 33: 48-52.
5. Bar, E., Rahamin, E., Keynan, A., and Sandler, N. 1991. Cloning and expression of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*  $\delta$ -endotoxin DNA in *Bacillus sphaericus*. J. Invert. Pathol. 57: 149-158
6. Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., and Dean, D. H. 1998. Revision of nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 807-813.
7. Crickmore, N., Zeigler, D. R., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Bravo, A., and Dean, D. H. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. 2002. [http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/index.html](http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html) (date site accessed).
8. Flamm, W. G. 2001. Elevating the terms of the GM food debate. Regul. Toxicol. Pharmacol. 33: 1.
9. Gavini, F., Mergaert, J., Beji, A., Mielcarek, C., Izard, D., Kersters, K., and De Ley, J. 1989. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. nov. Int. J. System. Bacteriol. 39:337-345.
10. Gill, S. S., Cowels, E. A., and Pietrantonio, P. V. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxin. Annu. Rev. Entomol. 37: 615-636.
11. Graham, T. L. 1988. Genetic engineering of soil microorganisms for pest control. Agric. Ecosys. Environ. 24: 317-323.
12. Hinton, J. C., Perombelon, M. C., and Salmond, G. P. 1985. Efficient transformation of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *E. carotovora* subsp. *atroseptica*. J. Bacteriol. 161: 786-788.
13. Hofte, H., and Whiteley, H. R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53: 242-255.
14. Kearns, L. P., and Mahanty, H. K. 1998. Antibiotic production by *Erwinia herbicola* Eh1087: its role in inhibition of

- Erwinia amylovora* and partial characterization of antibiotic biosynthesis genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1837-1844.
15. Lacy, G. H., and Sparks, Jr., R. B. 1979. Transformation of *Erwinia herbicola* with plasmid pBR322 deoxyribonucleic acid. *Phytopathology* 69: 1293-1297.
  16. Liu, Y. B., Tabashnik, B. E., Dennehy, T. J., Patin, A. L., and Bartlett, A. C. 1999. Development time and resistance to Bt crops. *Nature*. 400: 519.
  17. Murphy, R. C., and Stevens, S. D. 1992. Cloning and expression of *cryIVD* gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 and its resulting larvicidal activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1650-1655.
  18. Obukowicz, M. G., Perlak, F. J., Kuniko, K. K., Mayer, E. J., and Watrud, L. S. 1986. Integration of the  $\delta$ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* into the chromosome of root-colonizing strains of *Pseudomonas* using Tn5. *Gene* 45: 327-331.
  19. Perlak, F. J., Deaton, R. W., Armstrong, T. A., Fuchs, R. L., Sims, S. R., Greenplate, J. T., and Fischhoff, D. A. 1990. Insect resistant cotton plants. *Bio/Technol. (NY)* 8: 939-943.
  20. Perlak, F. J., Fuchs, R. L., Dean, D. A., McPherson, S. L., and Fischhoff, D. A. 1991. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3324-3328.
  21. Poppy, G. 2000. GM crops: environmental risks and non-target effects. *Trends Plant Sci.* 5: 4-6.
  22. Rangwala, S. H., Fuchs, R. L., Drahos, D. J., and Olins, P. O. 1991. Broad host-range vector for efficient expression of foreign genes in gram-negative bacteria. *Bio/Technol. (NY)*. 9: 477-479.
  23. Renner, R. 1999. Evaluating the environmental effects of the GM revolution. *J. Environ. Monit.* 1: 106N- 107N.
  24. Reverchon, S., and Robert-Baudouy, J. 1985. Genetic transformation of the phytopathogenic bacteria, *Erwinia chrysanthemi*. *Biochimie* 67: 253-257.
  25. Schnepf, H. E., Wong, H. C., and Whiteley, H. R. 1985. The amino acid sequence of a crystal protein from *Bacillus thuringiensis* deduced from the DNA base sequence. *J. Biol. Chem.* 260: 6264-6272.
  26. Smith, F. D., Harpending, P. R., and Sanford, J. C. 1992. Biolistic transformation of prokaryotes: factors that affect biolistic transformation of very small cells. *J. Gen. Microbiol.* 138: 239-248.
  27. Vaeck, M., Reynaerts, A., Hofte, H., Jansens, S., Beuckeleer, M. D., Dean, C., Zebeau, M., Montagu, M. V., and Leemans, J. 1987. Transgenic plant protected from insect attack. *Nature* 328: 33-37.
  28. Van Rie, J. 2000. *Bacillus thuringiensis* and its use in transgenic insect control technologies. *Int. J. Med. Microbiol.* 290: 463-469.
  29. Wallimann, T. 2000. Bt toxin: assessing GM strategies. *Science*. 287: 41.
  30. Wright, S. A., Zumoff, C. H., Schneider, L., and Beer, S. V. 2001. *Pantoea agglomerans* strain EH318 produces two antibiotics that inhibit *Erwinia amylovora* in vitro. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 284-292.

## ABSTRACT

**Lin, C. H.<sup>1,2</sup>, Huang, W. C.<sup>1</sup>, Tzeng, C. C.<sup>2</sup>, and Chen, L. J.<sup>1\*</sup> 2002. Insecticidal activity and plasmid retention of the epiphytic *Erwinia herbicola* strains transformed with the *Bacillus thuringiensis cryIAa1* gene.** Plant Prot. Bull. 44: 21 - 36. (<sup>1</sup>Institute of Molecular Biology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC; <sup>2</sup>Department of Bio-pesticide, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC)

The *cryIAa1* gene encoding insecticidal crystal protein (ICP) from the pES1 was cloned into an *E. coli* plasmid vector pTZ19U to form pUN4. The pUN4 was respectively transferred into three different isolates of epiphytic *Erwinia herbicola* (also known as *Pantoea agglomerans*) by electroporation. The transformed *E. herbicola* strains Eh4, Eh5, and Eh6 expressed ICP and conferred insecticidal activity. An amount of 2.5 mg/ml total protein extracts from the *E. herbicola* transformants resulted in 94 to 100 % mortality against the diamond back moth, *Plutella xylostella*. With much reduced amount (0.312 mg/ml) of total protein extracts, Eh4 and Eh5 still display 26 % and 42 % mortality, respectively. Time course effect on the insecticidal activity revealed that Eh4 or Eh5 could reach up to 84 % mortality after 48 hours of treatment using 1.25 mg/ml protein extracts. To test the stability of plasmid pUN4 in transformed *E. herbicola* strains, Eh4 and Eh6 were either subcultured daily for 14 days in ampicillin-free LB broth or sprayed on cabbage leaves for a month. The results showed that pUN4 in bacteria was excluded significantly one day after culture, then retained with a concentration of about  $10^7 - 10^{10}$  CFU/ml till the end of the test period, while the bacterial concentration in ampicillin-free media remained the same as those of the first day ( $10^{13}$  CFU/ml). Distribution of transformed *E. herbicola* strains on cabbage leaves decreased gradually from  $10^6 - 10^7$  CFU/ml to about  $10^4$  CFU/ml in a week and almost completely eliminated after a month under green house condition, while non-transformed *E. herbicola* retained at about  $10^5$  CFU/ml. The insecticidal activity detected in transformed *E. herbicola* strains and the characteristics that the recombinant plasmid will eventually be eliminated in the environment makes the transformed *E. herbicola* strain a good candidate as one of the environmental friendly biopesticides.

(Key word: epiphytic *Erwinia herbicola*, *Bacillus thuringiensis*, insecticidal crystal protein, gene transformation, biopesticide, biological control)

\*Corresponding author. E-mail: ljchen@dragon.nchu.edu.tw