利用生物技術～進行作物抗病及抗蟲育種

文圖／蕭政弘

前言

作物病害及蟲害常年危害農作物，造成巨大損失，而防治病蟲害最有效的措施是栽培抗病及抗蟲品種。爲選育抗蟲及抗病品種，傳統的方法是利用雜交來進行作物抗病及抗蟲性改良，但雜交技術係以整個染色體組導入，仍有同時導入不良性狀之缺點。近年來由於生物技術之進展，人們得以直接從植物的遺傳物質－核酸(DNA)著手，應用基因重組及轉殖技術，將來自不同植物、動物或微生物之基因做一組合與利用，以克服傳統育種上之限制。此外利用分子標誌因子，更可減少田間選拔工作，縮短育種年限。

生技抗病抗蟲育種之近程及轉殖技術

自 1984 年人類首度將細菌抗 kanamycin 基因轉移到菸草中表現開始，此後有非常多的學者致力植物基因轉殖的研究。1986-1993 年全世界共有 311 個有關抗病抗蟲的轉基因作物在進行田間試驗，1994 年 Calgene 公司推出第一個轉基因番茄(Flavr Savr)，並取得核可正式上市。其後 Asgrow 公司更推出抗病毒之夏南瓜，Monsanto 公司則推出抗蟲之馬鈴薯。台灣則分別於 1996 與 1997 年經農委會正式核准抗木瓜輪點毒素病毒(PRSV)及抗胡瓜嵌紋病毒(CMV)之轉殖番茄，進行田間試驗。截至 2001 年，全球已有 7.8 百萬公頃之抗病抗蟲轉殖基因作物被應用於商業生產，作物以棉花、大豆、玉米、馬鈴薯及油料作物等大宗作物爲主。

利用生技進行抗病及抗蟲育種，基本上就是將抗病及抗蟲基因轉殖至作物，其步驟可分成四個階段：一、組織培養之利用與再生系統之建立。二、抗病及抗蟲基因之重組。利用限制酶(restriction enzyme)將基因自其所在的染色體組(genome)切離出來，再利用結合酶(ligase)設法將基因構築在易於操作的載體(vector)。這個載體本身除帶有抗病抗蟲基因外，還必須具備一段報導基因(report gene)，如 gus 基因、kanamycin 基因、streptomycin 基因等，以方便大量繁殖此基因及轉殖後轉殖株的初步篩選。三、利用有效的基因轉殖方法將基因送入植物細胞內。轉殖法可分爲直接和間接轉殖兩大類。直接法是指將植物細胞浸泡在 DNA 溶液中，再藉助各種方法或物質，使 DNA 進入植物細胞中，主要包括浸泡培養法、電穿孔法、微量注射法及 PEG 法。間接法則爲利用介質將所要的基因送入植物細胞內、包括農桿菌法、粒子鎗法、微注射法、脂微粒法、花粉管法，其它如病毒載體法、雷射法、生物素法、輕微超音波振盪法、電泳法，由於發展時間較短，穩定性及使用並不多。四、檢定轉殖後的細胞或植株是否含有此外來基因(foreign gene)，並偵測此基因是否表

現，並遺傳至後代。檢定的方法有南方浸漬法(southern bloting)，用以偵測抗病及抗蟲基因是否轉入植株；北方浸漬法(northern bloting)，偵測抗病及抗蟲基因是否正常轉錄爲 RNA；西方浸漬法(western bloting)，偵測抗病及抗蟲基因是否正常轉譯爲蛋白質。當然最後轉殖株還需經過抗病及抗蟲檢定，才能正式申請核准進行田間試驗。

目前重要之抗病及抗蟲基因

由昆蟲、真菌、細菌及病毒等病原菌所造成的病害與蟲害，是導致全球作物減產的主要因素之一。由於九十年代植物基因轉殖的發展，證實利用生物技術來改善植物抗病蟲害是可行。利用基因轉殖抗蟲及抗病毒基因作物已經研發成功且上市。抗真菌及細菌病性病害的基因轉殖作物研究較爲遲緩。目前重要之抗病及抗蟲基因可分爲四大類：

一、抗蟲基因

近年來利用基因轉殖育成抗蟲作物有很大的成就。其中以蘇力菌 BT (*Bacillus thuringiensis*)之毒素基因 ICP 又稱(cry 基因)應用最廣。蘇力菌是存在土壤中之一種革蘭氏菌，它在產生孢子的過程中，會同時產生一種蛋白結晶 d - endotoxins，當昆蟲食用進入鹼性腸胃時，毒蛋白結晶溶化，然後毒素前體水解成毒性物質，此毒性胜酶可引起腸之麻痺及穿孔，使幼蟲停止攝食而死亡。台灣在二十年前即引入，作爲防蟲農藥。近年來拜分子生物發展之賜，蘇力菌之 cry 基因不僅被分離出來，且進行修改與部份刪除以強化毒蛋白之表現，並成功轉殖到作物中。目前 cry 基因依防治對象不同可分爲 cry Ⅰ (鱗翅目)、cry Ⅱ (鱗翅目、雙翅目)、cry Ⅲ (鞘翅目)、cryⅣ (雙翅目)、cry Ⅴ (線蟲)等五種。目前商業化之轉基因抗蟲作物，都以此類基因爲主，如玉米、棉花及馬鈴薯。

除 BT 基因外，幾個源自於植物的殺蟲蛋白，如蛋白酶抑制物(protease inhibitors)及澱粉水解酵素抑制物(amylase inhibitor)等也積極被開發。當昆蟲消化高劑量時，能阻礙昆蟲生長與發育。蛋白酶抑制物是許多植物演化而來的抗蟲機制，此抑制蛋白具抗代謝活性，使昆蟲腸道內蛋白質無法代謝並利用，造成昆蟲發育不良，取食量降低、減少繁殖率。蛋白酶抑制物可分成四大類：serine (antitrypsin or chymotrypsin)、thiol (cysteine)、metallo-、aspartyl-。將豇豆種子內之胰凝乳蛋白酶抑制物(chymotrypsin inhibitor，CpTI)基因、或馬鈴薯之 wound-induced protease inhibitors (PI-I 及 PI-II)基因轉移到菸草中，可獲得抗蟲植株。菜豆之 α-amylase inhibitors (α-AI)基因，轉移到豌豆中大量表現，可有效防治田間及種子貯藏時之害蟲。

二、抗病毒基因

抗病毒植物的基因工程主要來自病毒本身，包括鞘蛋白(coat protein, CP)基因、衛星 RNA（satellite RNA）基因及反義 RNA (antisense RNA)基因。鞘蛋白基因的作用機制包括防止病毒脫鞘及干擾其轉譯作用，將煙草嵌紋病毒(TMV)之鞘蛋白病毒基因轉殖於番茄，育成抗番茄鑲嵌病毒(ToMV)及 TMV 之番茄植

株。利用葡萄病毒 B (grape virus B)之病毒鞘蛋白，育成抗葡萄病毒 B 之葡萄。病毒衛星 RNA 可干擾病毒 RNA 作用因而改變病癥，轉殖煙草輪點毒素病衛星 RNA 於植物時可獲抗病毒之植株。轉殖煙草 TMV 之反義 RNA，可使病毒基因與之結合且無法表現。

三、抗真菌性病害基因

利用生物技術進行抗真菌作物育種，主要所採取之對策包括，(1)讓植物大量表現分解真菌細胞壁的酶。(2)抑制真菌活性的蛋白質或化學物。(3)感應病原菌感染及啓動植物防禦系統之訊息傳遞蛋白。(4)活化氧化物，使病原菌死亡或隔絕其感染及傳播途徑。分解真菌細胞壁酶如幾丁酶(chitinase)及 β-1,3 聚葡萄糖酶，可抵抗真菌侵襲，由菜豆所選殖幾丁酶基因轉殖至煙草中可得到抗 *Rhizoctonia solani* 之植株。植物毒素(phytoalexins) 已被認爲是真菌侵害植物時所產生之抗性物質，由葡萄選殖合成酶(stibene synthase)基因轉移至煙草，得到抗灰霉病菌 *Botrytis cinerea* 之植株。與抗性系統認知(systemin acquired resistant, SAR)有關的病原相關(pathogenesis-related, PR)蛋白質，例如 PR1-a，在轉殖煙草大量表現可抗 2 種 Oomycete 病原菌。大量表現煙草的 PR-5 (osmotin)，可顯著的延緩 *Phytophthora infestant* 所造成的壞疽。因此同時轉移幾個 PR 基因，可能會研發出商業上有用的抗真菌轉殖植物。活性氧物質(例如 H_2O_2)在預防病原菌感染上扮演了一個重要的角色，轉移 glucose oxidase 到馬鈴薯，加強 H_2O_2 的產生，已證實可抗真菌性及細菌性病害，因此提高植物的活性氧物質，可能是使植物耐多樣性病害的可行途徑。

四、抗細菌性病害基因

抗細菌性病原菌之抗病育種研究，目前是所有抗病研究中進展最緩慢。抗細菌基因之來源包括(a)Lytic peptides：主要存在於昆蟲或動物；(b)Lysozymes：如噬菌體 T4、P22 均具有此基因，或由雞、鴨、鳥亦可得到。轉移噬菌體 T4 Lysozyme 基因到馬鈴薯種球可抗軟腐病；(c)Attaciins：*Hyalophora cecropia* 對細菌免疫時會產生毒素；(d)植物細胞壁蛋白質：如 thionins，當轉移大麥的 α-thionin 到煙草，顯著增加抗細菌性病害 Pseudomonas。

以分子標誌輔助抗病抗蟲育種之理論與實際

在傳統抗病及抗虫育種上，爲達到育種目標，必需有理想之選拔指標，以植株形態形狀作爲遺傳標誌之缺點很多，例如有些隱性同形型接合子易導致植株死亡或不能存活、基因作用常有上位性或多效性、性狀之調查有時間性或其表現易受環境因子影響等缺點。而分子標誌則提供育種家一些直接辨識基因型的工具。目前普遍可利用於分析之分子標誌有三種：1.同功異構酶電泳分析法(Isozyme electrophoresis)。2.限制酶片段長度多型性分析(Restriction fragment length polymorphisms,RFLPs)。3.逢機增殖片段多型性(Ra ndom amplified polymorphic DNA,RAPD)。

一、同功異構酶：

同功異構酶是指具有相同且專一性之受質，但分子型態不同的一群酶，個體間同功異構酶之變異是受基因所控制。同一基因座因對偶基因之不同，則其同功異構酶會有變異，而在酶電泳圖譜上表現出多型性，可利用其共顯性關係作爲作物育種選拔之工具。如控制番茄酸性磷酸酶的 Aps-1 基因和抗線蟲之顯性基因有連銷關係，利用 Aps-1 基因當作指標可篩出抗線蟲的番茄。

二、限制酶片段長度多型性分析

當 DNA 片段發生鹼基的取代、插入或缺失，而造成序列上的差異，以致於限制酶分切之 DNA 與原來之 DNA 片段不等長，而在 DNA 層次上表現出多型性。DNA 經過限制酶切割，再經電泳將切割片段依長度分離，並轉移至轉漬膜上，然後選擇含放射性標記之特殊 DNA 做探針，與 DNA 雜配(hybridize)，利用放射性自動顯影顯出有雜配部份以做譜系分析。在番茄利用 RFLP 標誌與性狀基因間之關，探討如抗病性、抗蟲性、抗真菌性及其他數量性狀與分子標誌間之關係。在萵苣用以探討抗露菌病與分子標誌間關係。

逢機增殖片段多型性

RAPD 爲聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)的一個特例。RAPD 所採用之引子(primer)通常較短(5-10 鹼基)，因此在染色體組 DNA 上可找到許多的互補接點，經聚合酶在相鄰而方向相對的二個接合點間作用，產生長度不同的增殖產物，於電泳及螢光染色後即可在紫外燈下觀察，一般可得到 3-12 個條帶。但目前已被廣泛應用於蔬菜品種之鑑定。

生技抗病抗蟲育種潛藏之問題及解決之道

一、雖然利用生物技術進行作物抗病抗蟲育種，可說是作物育種利用上之一大福音，但亦潛藏著一些可能的問題，針對這些可能存在的問題科學家亦提出部份的解決之道。一、昆蟲對轉基因作物產生抗性。BT 基因作物可說是生物技術運用最成功的例子，隨著使用的增加，昆蟲產生抗藥性的疑慮越來越大。爲了避免昆蟲抗藥性的產生，目前提出了幾個策略：(a)採收後儘早將殘株剷除，減少昆蟲抗性選殖的時間。(b)庇護所(refugia)的設立，田間不完全栽培抗蟲品種，仍保留部份感蟲品種，抗蟲性越高品種，其庇護區設置範圍越大，以減少自然選殖的壓力。(c)隨時更換種植帶有不同抗蟲基因的作物。

二、基因漂移使基因轉移至非目標作物。當轉基因作物被釋放到田間，其抗性基因可能隨著花粉而轉移到作物本身之近緣野生種，造成生態問題。有鑑於此，改良基因的表現方式就成了重要的話題，其中較爲可行的辦法就是以葉綠體取代細胞核來表現目標基因，葉綠體本身帶有基因體組，可將外來基因轉入並表現，再則葉綠體基因屬母系遺傳，故不會隨著花粉傳播造成基因污染。

三、有益昆蟲及非防除昆蟲之死亡。在英國蘇格蘭就有這樣的報導，當瓢蟲吃了轉基因馬鈴薯植株上的蚜蟲，其壽命減少一半，且所下的卵非常

少。美國康乃爾大學曾將帶 BT 基因之玉米花粉，噴佈在帝王蝶的食草 milkweed 上，當帝王蝶的幼蟲食用帶有 BT 基因玉米花粉之食草後，存活率及取食量皆有下降的趨勢，因此推測 BT 玉米花粉會隨風，將花粉傳播至 milkweed 上，破壞帝王蝶的生態。

四、轉基因作物之食用安全問題。在基因轉殖過程中爲提高效率，報導基因的使用相當必要。這些報導基因例如抗 kanamycin 基因、streptomycin 基因或 neomycin 基因，在轉殖成功後，這些報導基因已無意義，但卻持續表現，這些基因本身及其所產生之蛋白質，對人是否具備毒性及過敏性，會不會與腸道微生物進行水平轉移，增加微生物之抗藥性都另人質疑？目前的證據多指出這些報導基因及所產之蛋白，在進入腸道後很快就降解，與其它食物並無異常，世界衛生組織及美國食品暨藥物管理局得出結論，認爲食物中的轉基因 DNA 本身並無安全性的問題。儘管如此，絕大多數消費者，仍對轉基因作物的食用安全性感到困惑。爲減少如此困擾，一些較不具爭議的報導基因如抗逆境之甜菜鹼(betaines)基因、及將報導基因構築於可移除之轉作因子(transposable element)上，都是未來發展的方向。

五、廠商可能的錯誤及消費者的不信認感。在美國就曾有生技公司將未測試及發照之油菜種子售出。2001 年 Monsanto 公司轉基因馬鈴薯在美國及加拿大停售，主要是很多食品大廠很怕自己的商標與轉基因食物劃上等號。另外，過高的權利金亦讓農民裹足不前。

結論

1970 年代當生物技術剛開始被提出用於農業時，在這樣理論基礎下，生物技術被認爲無所不能。如未來牛可以像長頸鹿一樣大，甘藍可以像藥球一樣大又重。到 1980 年代科學家發現分生技術要利用於農業商用生產上有其困難度，可能需要更多的發展時間，並非一蹴可及。但到 1990 年代，經過 20 年努力，終於開花結果，生物技術成功且廣泛的應用於農業生產，被喻爲「第二次綠色革命」。雖然分生技術存在相當風險，但其對人類生活的貢獻也是有目共睹，兩者之間如何取得平衡，「管理」將是重要的課題。