

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

綠豆抗蟲蛋白質之抗蟲功能與機制(1/2)

計畫類別：整合型計畫

計畫編號：NSC91-2317-B-002-025-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：國立臺灣大學昆蟲學系暨研究所

計畫主持人：洪淑彬

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 5 月 23 日

抗蟲蛋白質的功能基因體學的研究與應用 子計劃四--綠豆抗蟲蛋白之抗蟲功能與機制

台大昆蟲系 洪淑彬

計畫編號：NSC 92-2317-B-002-008

執行期限：92年8月1日至93年7月31日

摘要

為探討綠豆抗蟲蛋白 VrCRP 的抗蟲活性，首先我們以 VrCRP 蜜水來餵食東方果實蠅(*Bactrocera dorsalis*)及東方果實蠅寄生蜂—跳腳小蜂(*Dihhinus giffardii*)，結果其壽命及死亡率與對照組並無顯著差異。其次則是餵食斜紋夜盜(*Spodoptera litura Fabicius*)幼蟲含有抗蟲綠豆粉的人工飼料，結果在生長及存活率上，皆較對照組顯著為低。最後將四紋豆象(*Callosobruchus maculatus* 4c6-4 品系)飼養於含有 VrCRP 的抗蟲品系綠豆(VC 6089A)中，進行五個世代試驗後，豆象的存活率並沒有顯著的提高，顯示族群對抗蟲綠豆抗性的發展緩慢，但羽化成蟲的生殖力卻有顯著增加的情形，因此仍有可能產生對抗蟲綠豆具抗性的豆象族群。總之，我們發現 VrCRP 對於膜翅目及雙翅目的影響不大，對於鱗翅目及鞘翅目的影響較為顯著，值得進行進一步的試驗。

目的

本計劃主要是以計劃中所提供的綠豆抗蟲蛋白質 VrCRP 做抗蟲活性的研究，並就昆蟲分類群中危害台灣主要作物的重要害蟲、可能危害之非標的天敵和有用昆蟲為目標，規劃出以下六種受試昆蟲：

- 1)東方果實蠅(*Bactrocera dorsalis*)。
- 2)東方果實蠅寄生蜂—跳腳小蜂(*Dihhinus giffardii*)。
- 3)斜紋夜盜(*Spodoptera litura Fabicius*)。
- 4)四紋豆象(*Callosobruchus maculatas* 4c6-4 品系)。

5)桃蚜 (*Myzus persicae*)。

6)蜜蜂 (*Apis mellifera*)。

目前進行中的為 1)~4)的昆蟲，我們期望找出 VrCRP 是否對此四種受試昆蟲有影響，並找出此防禦素的抗蟲範圍、及對非標的昆蟲可能造成的影響。

材料與方法

VrCRP 對東方果實蠅(*Bactrocera dorsalis*)及跳腳小蜂(*Dihhinus giffardii*)之影響

以羽化 3-5 天之東方果實蠅成蟲為實驗對象，將其飼養於 31ml 之塑膠透明離心管，每管 10 隻，飼養環境為 25°C、50± 5%RH、12:12(D:L)。分別配製含 0%及 0.2% VrCRP 之 water agar(表一)為飼料，每種飼料兩重複，每天更換新飼料且觀察其死亡率，共五天。五天後，兩種處理皆餵以不含 VrCRP 之 water agar，每天更換飼料及觀察死亡率直到所有蟲皆死亡為止。

以剛羽化之跳腳小蜂成蟲為實驗對象，將其飼養於 31ml 之塑膠透明離心管，每管 8 隻，飼養環境為 25°C、50± 5%RH、12:12(D:L)。分別配製含 0%及 0.2% VrCRP 之 water agar(表三)為飼料，每種飼料兩重複，每天更換新飼料且觀察其死亡率，共五天。五天後，兩種處理皆餵以不含 VrCRP 之 water agar，每天更換飼料及觀察死亡率直到所有蟲皆死亡為止。

VrCRP 對斜紋夜盜(*Spodoptera litura Fabicius*)之影響

分別配製不含綠豆、含感蟲綠豆

(1973A)及含抗蟲綠豆(6089A) 這三種的人工飼料(表五)，以六合一培養皿為飼養容器，分別放入四齡斜紋夜盜幼蟲，且每種處理皆兩盒(12 隻)。每天觀察並記錄 a)死亡率 b)蟲重 c)化蛹率 d)蛹重 e)羽化率。飼育環境：25°C、75± 5%RH、12:12(D:L)。

累代生長於抗蟲品系綠豆對四紋豆象之影響

將四紋豆象(*Callosobruchus maculatus* 4c6-4 品系)飼養於含有 VrCRP 的抗蟲品系綠豆(VC 6089A)中，紀錄能從抗蟲綠豆中成功羽化之蟲體的各项生活史特性，並將這些具抗性的雌雄蟲個別交配，再置入抗蟲綠豆中。經過五代之篩選，觀察每一代四紋豆象生活史特性改變的情形，並探討抗性傳遞的情況與其衍生的問題。

結果與討論

以含有 VrCRP 之 water agar 餵食東方果實蠅(*Bactrocera dorsalis*)及跳腳小蜂(*Dihhinus giffardii*)後，發現和餵食不含 VrCRP 之 water agar 的相比，兩種蟲皆較早出現死亡，且壽命較短，但兩組差距並不顯著(表二、圖一)、(表四、圖二)。因此在這個實驗中，我們可初步發現 VrCRP 對膜翅目及雙翅目的影響不大，就防治方面而言可能並沒有太大的功用；不過對膜翅目天敵之負面影響也可能不大。

在斜紋夜盜(*Spodoptera litura* Fabricius)的實驗中，目前我們實驗只進行到幼蟲的階段，不過在我們初步觀察斜紋夜盜幼蟲的死亡率及生長情形後，發現餵食含 VrCRP 之抗蟲綠

豆(6089A)人工飼料的斜紋夜盜幼蟲，比餵食其他兩種飼料的幼蟲生長皆較緩慢，且有較高的死亡率(圖三~圖五)。因此我們認為 VrCRP 對鱗翅目的影響較顯著，不過因為我們餵食的是抗蟲綠豆粉，所以也有可能是綠豆本身營養成分影響到斜紋夜盜的死亡率和生長，接下來我們以純的 VrCRP 來做試驗，以確實了解 VrCRP 對斜紋夜盜的影響情形。

關於四紋豆象(*Callosobruchus maculatus* 4c6-4 品系)在抗蟲品系綠豆上的累代生長情形，每一代生活史特性的表現如表六及圖六至九所示，其中在這五代間具顯著差異的特性包括雄成蟲的壽命，雌蟲的生殖力，以及每代雌蟲所生後代的死亡率。在雌蟲生殖力方面，由圖八可以看出雌豆象一開始三代在抗蟲豆上的生殖力逐漸降低，不過卻在第四代(F3 子代)顯著的攀升，在圖九雌蟲後代死亡率方面亦呈現相符合的後代死亡率降低之結果，雖然進行五個世代試驗，豆象的存活率並沒有顯著的提高，顯示族群對抗蟲綠豆抗性的發展緩慢，但因生殖力有顯著上升的現象，因此仍有可能產生對抗蟲綠豆具抗性的豆象族群。此結果提供 VrCRP 在未來生物製劑的開發上必須考量的課題。

參考文獻

Kaga, A. M. Ishimoto. 1998. Genetic localization of a bruchid resistance gene and its relationship to insecticidal cyclopeptide alkaloids, the vignatic acids, in mungbean

- (*Vigna radiata* L. Wilczek). Mol. Gen. Genet. 258: 378-384.
- Yao, A. L. 1987. The Biological Characteristics, reproductive capacity and control effect of *Dirhinus Giffardii* weld (HYM.:Chalcididae). Bull. Inst. Zool., Academia Sinica 26: 47-52.
- Carlini, C. R. and M. F. Grossi-de-Sa. 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. Toxicon 40:1515-1539
- Chen, K. C. 2002. Studies on the expression and functional analysis of VrCRP and VrArc bruchid resistance genes from mung bean seeds. Ph.D. dissertation. Institute of Agricultural Chemistry, National Taiwan University, Taipei. 172 pp.
- Quimio, G. M. and G. H. Walter. 2001. Host preference and host suitability in an egg-pupal fruit fly parasitoid, *Fopius arisanus* (Sonan) (HYM., Braconidae). J. Appl. Ent. 125, 135-140.
- Hsu, J. C. and H. T. Feng. 2000. Insecticide Susceptibility of the Oriental Fruit Fly (*Bactrocera dorsalis*(Hendel))(Diptera: Tephritidae) in Taiwan. Chin. Entomol. 20: 109-118.
- Kuan, C. C. 1998. Studies on the expression and biological activity of a bruchid resistance-related cDNA clone from mung bean. Master Thesis. Institute of Agricultural Chemistry, National Taiwan University.
- Paes, N. S., I. R. Gerhardt, M.V. Coutinho, M. Yokoyama, E. Santana, N. Harris, M. J. Chriseels, and M. F. Grossi-de-Sa. 2000. The effect of arcelin-a on the structure of the midgut of bruchid larvae and immunolocalization of the arcelin protein. J. Insect Physiol. 46: 561-615.
- Sales, M. P., P. P. Pimenta, N. S. Paes, M. F. Grossi-de-Sa, and J. Xavier-Fiho. 2001. Vicilins(75 storage globulins)of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds bind to chitinous structures of the midgut of *Callosobruchus maculatus*(Coleoptera:Bruchidae) larvae. Braz. J. Med. Bio. Res. 34:27-34.
- Singh, B. B., S. R. Singh, and O. Adjadi. 1985. Bruchid Resistance in Cowpea. Crop Sci. 25: 736-739.

表一 東方果實蠅之人工飼料配方

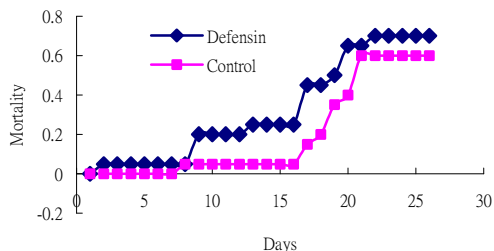
| | | |
|-------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| | 含 0% VrCRP 之 water agar ----- 共 1.7g | 含 0.2% VrCRP 之 water agar----- 共 1.7g |
| VrCRP | 0g | 0.0034g |
| Agar | 0.02g | 0.02g |
| 蔗糖 | 0.5g | 0.5g |
| 酵母粉 | 0.1g | 0.1g |
| 蒸餾水 | 1.046g | 1.08g |

表三 跳腳小蜂之人工飼料配方

| | | |
|-------|--------------------------------------|--|
| | 含 0% VrCRP 之 water agar ----- 共 0.8g | 含 0.2% VrCRP 之 water agar ----- 共 0.8g |
| VrCRP | 0g | 0.0016g |
| Agar | 0.016g | 0.016g |
| 蜂蜜 | 0.08g | 0.08g |
| 蒸餾水 | 0.704g | 0.7024g |

表二 VrCRP 對東方果實蠅之影響

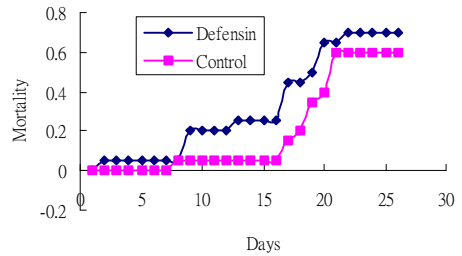
| 處理 | N | 平均(天) | SE | P |
|-------|----|-------|------|-------|
| 無 | | | | |
| VrCRP | 20 | 21.45 | 1.05 | 0.110 |
| 有 | | | | |
| VrCRP | 20 | 18.35 | 1.57 | |



圖一 VrCRP 對東方果實蠅死亡率之影響情形

表四 VrCRP 對跳腳小蜂之影響

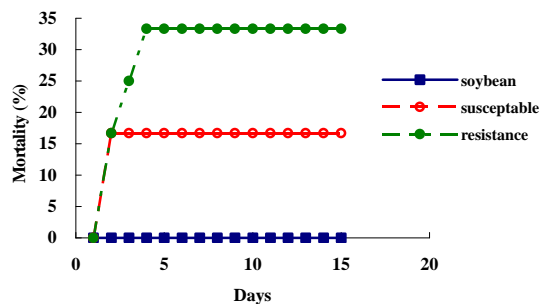
| 處理 | N | 平均(天) | SE | P |
|-------|----|-------|------|-------|
| 無 | | | | |
| VrCRP | 16 | 23.44 | 0.86 | 0.084 |
| 有 | | | | |
| VrCRP | 16 | 20.88 | 1.14 | |



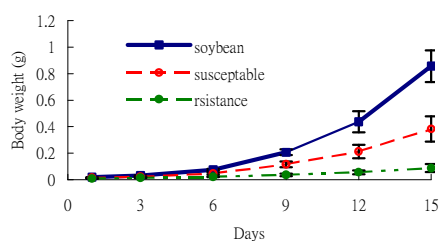
圖二 VrCRP 對跳腳小蜂死亡率之影響

表五 斜紋夜盜之人工飼料配方

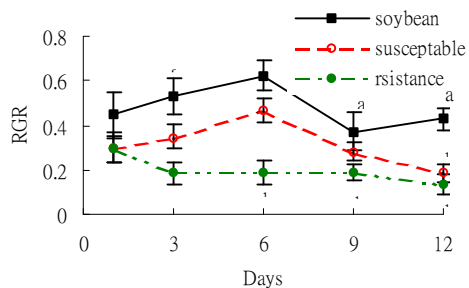
| <營養粉末> | | |
|--------------------------|------------------------|------------------------|
| (1)不含綠豆粉 | (2)含感蟲綠豆粉 | (3)含抗蟲綠豆粉 |
| Kidney bean (花豆粉) 132 g | Mung bean (1973A) 132g | Mung bean (6089A) 132g |
| Soybean powder (黃豆粉) | | 132 g |
| Wheat germ (小麥胚芽E粉) | | 264 g |
| Yeast powder (酵母粉) | | 120 g |
| <化學藥劑> | | |
| Ascorbic acids | | 12 g |
| l-cysteine | | 1.2 g |
| Sorbic acids | | 0.6 g |
| Methyl-p-hydroxybenzoate | | 6 g |
| Chloramphenicol | | 0.6 g |
| <其他> | | |
| Agar | | 42 g |
| Dist. water | | 1800 ml |



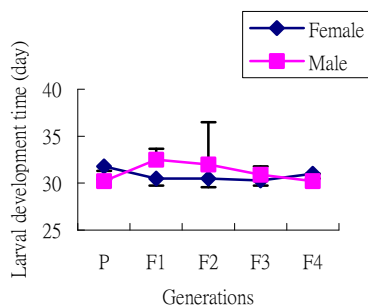
圖三 不同處理對斜紋夜盜死亡率之影響



圖四 不同處理對斜紋夜盜生長之影響



圖五 不同處理對斜紋夜盜 RGR 的影響

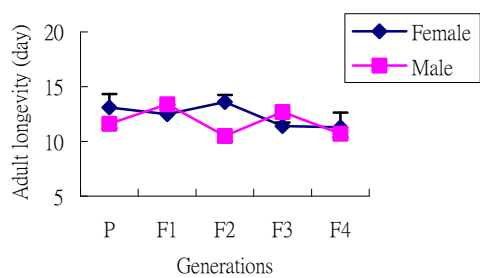


圖六 累代生長於抗蟲品系綠豆對四紋豆象幼蟲發育期之影響情形

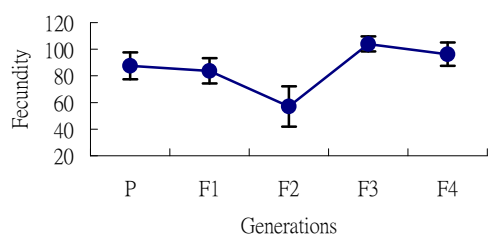
表六 累代生長於抗蟲品系綠豆對四紋豆象各種生活史特性所造成之影響情形

| Generations | Development time | | Longevity | | Fecundity | Emergence rate | Sex ratio f : m |
|-------------|------------------|------|-----------|--------------------|--------------------|----------------|--------------------|
| | female | male | female | male | | | |
| P | 31.8 | 30.2 | 13.1 | 11.6 ^{ab} | 87.5 ^{ab} | 3.6% | 8 : 5 |
| F1 | 30.5 | 32.5 | 12.5 | 13.4 ^a | 83.8 ^{ab} | 2% | 6 : 8 |
| F2 | 30.5 | 32.0 | 13.6 | 10.5 ^b | 57.0 ^b | 1.99% | 8 : 2 |

| | | | | | | | |
|----|------|------|------|--------------------|--------------------|-------|-------|
| F3 | 30.3 | 30.9 | 11.4 | 12.7 ^{ab} | 104.0 ^a | 3.7% | 8 : 9 |
| F4 | 31.0 | 30.2 | 11.3 | 10.7 ^b | 96.3 ^a | 1.68% | 8 : 6 |

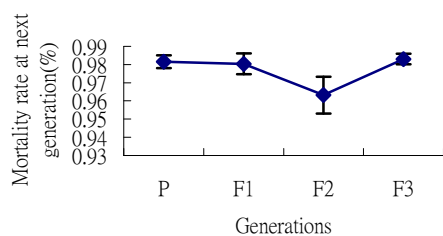


圖七 累代生長於抗蟲品系綠豆對四紋豆象成蟲壽命之影響情形



圖八 累代生長於抗蟲品系綠豆對四紋

豆象雌蟲生殖力之影響情形



圖九 累代生長於抗蟲品系綠豆對每雌蟲後代死亡率之影響情形