

# 應用花粉管導入法建立甘藍抗病耐熱基因之轉殖研究

廖芳心

甘藍(*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.)在蔬菜分類上屬於結球葉菜類，由於葉球質地脆嫩，耐運輸、耐貯藏，市場架售時間較長，烹調方便，又可生食做沙拉，加工製成泡菜、冬菜，且為冷凍水餃之重要材料為台灣地區重要蔬菜之一。目前甘藍產業面臨許多問題，主要為缺乏適合平地栽培之耐熱品種。夏天利用高冷地栽培，雖可補充供應夏季蔬菜之不足，但高冷地土地超限利用，影響水土保持及山坡地保育，故育成夏季平地結球品質良好之耐熱品種為當務之急。此外栽培甘藍時，小菜蛾、紋白蝶等蟲害嚴重，軟腐病、黑腐病及病毒病等重要病害不易防治，不但增加生產成本，且影響結球品質降低產量，故育成抗蟲、抗病品種亦為重要之育種工作。

近年來，生物技術應用於輔助傳統育種，在許多作物上已有顯著成果。在眾多的基因轉殖方法中，由於花粉管導入法轉殖基因，不需要貴重之儀器，且可直接得到種子，無需經由組織培養，可避免誘導再生植株之問題，較易實際應用於輔助傳統育種。本試驗之目的為以花粉管基因導入法建立甘藍有效且穩定耐熱抗病之基因之轉殖，進而輔助甘藍抗病及耐熱育種。

經以針筒由柱頭注射外源 DNA，於授粉同時，授粉後 12 小時，24 小時等三種不同時間進行處理，長角果收穫率分別為 40%、30%、35%，處理間差異未達顯著水準，但種子收穫數則以授粉同時注射外源 DNA 之處理者最少。授粉後 12 小時及 24 小時處理者，平均每果莢種子數差異不顯著，實際應用上以授粉後 24 小時處理較方便。

以甘藍栽培品種"初秋"為接受親，利用花粉管基因導入法轉殖含 GUS 報導基因及 NPTII 篩選基因之 pRT99gus 質體，其所得之第一代種子經播種 150 粒得到成活 137 株，分別進行以噴施 kanamycin 篩選及南方氏雜交分析，結果顯示 34 株(24.82%)對 kanamycin 具抗性，29 株(21.16%)具有南方氏雜交條帶，同時具有抗 kanamycin 又具雜交條帶者有 13 株(9.49%)。將具有南方氏雜交條帶之  $T_1$  植株自花授粉後採收種子，分析其中三個  $T_1$ (No. 36, No. 44, No. 45)之後代  $T_2$ ，具有南方氏雜交條帶之比例分別為 16/18, 51/71, 3/4，顯示外來基因可以遺傳至  $T_2$  世代。再分析其中一株  $T_2$ (No. 44-74)之後代  $T_3$ ，具有南方氏雜交條帶之比例為 28/35。故由分子層次證實外來基因可經由花粉管導入法進入植物基因組，且遺傳至子代。

為測試花粉管基因導入法能否將特殊外表型導入甘藍基因組，並表現之，以"紅甘藍"為核酸供給親，"初秋"品種為接受親，結果 4/64 株葉片肥厚且具革質，莖部呈現紅色，如同紅甘藍，以 RAPD 分析證實外源 DNA 已進入接受親。為探討應用花粉管基因導入法輔助抗病育種之可行性，以抗黑腐病之甘藍品種 PI281552 為供給親，"初秋"品種為接受親，檢定轉殖之  $T_1$  植株，56/237 株(27/137 株及 29/100 株)呈抗病性反應，分析外表型結果如表 1，抗病性與外表型沒有連鎖關係，和雜交育種結果不同，並以 RAPD 分析證實外源 DNA 進入接受親，結果見圖 1。應用花粉管導入法以從事甘藍耐熱因子導入，以本地種 813 系為接受親，以耐熱之"夏光"品種為供給親。以 RAPD 分析轉殖之  $T_1$  植株證實外源 DNA 進入

接受親。目前於田間篩選結球性狀良好之抗病或耐熱單株，當作育種材料。

綜合本試驗結果證明外源 DNA 確實可經由花粉管導入法進入染色體，且可表現，對於基因調控機制不清楚之農業性狀，可應用此一技術輔助育種。且可轉殖其他植物、動物或微生物之基因，創造新種。

## 相關文獻

1. 廖芳心。1996。應用花粉管導入法建立甘藍基因轉殖系統之研究。台灣大學園藝學研究所博士論文 pp.131。
2. 廖芳心、黃鵬林。1995。利用花粉管導入法建立甘藍基因轉殖系統之研究。中國園藝 41:201-214。
3. 廖芳心、黃鵬林。1996。應用花粉管法轉移甘藍基因注射處理時間之探討。中國園藝 42:289-301。

表 1. 以花粉管導入法轉殖 PI281552 至初秋 T<sub>1</sub> 性狀調查

Table 1. The characters of T<sub>1</sub> of KY cross injected with total DNA of PI281552 *via* pollen tube pathway

	株數	開花株數	不開花株數	抗病株數	不抗病株數
外表型類似初秋	18	17		4	13
外表型介於兩親之間	70	49	1	1	
			21	5	16
外表型類似 PI281552	12	4		3	1
			8	7	1
合計	100	70	30	29	71

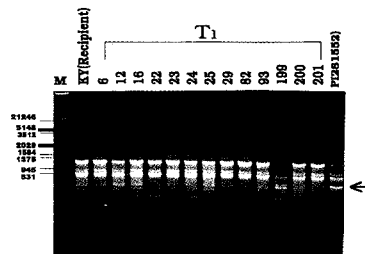


圖 1. 核苷酸增幅指紋分析接受親(初秋)、供給親(PI281552)及應用花粉管導入法得到之 T<sub>1</sub> 子代族群

Fig. 1. RAPD analysis of recipient plant (KY cross), donor plant (PI281552) and 13 T<sub>1</sub> plants *via* pollen tube pathway. The synthesized primer UBC194 shows the bands that specific to the donor plant and some T<sub>1</sub>.