

菊花轉殖抗蟲基因之研究

陳裕星、白桂芳、蔡奇助、黃勝忠

目 的

菊花為世界三大切花之一，也是國內最重要之切花產業，在田間露地栽培時容易遭受病蟲害需依賴化學農藥來控制。然而菊花因為受限於高倍數染色體使傳統之抗蟲抗病育種不易達成。在抗蟲育種方面，利用蛋白酶抑制基因進行抗蟲育種逐漸受到相當多的矚目，因為蛋白酶抑制基因是植物本身自然演化抗蟲的機制之一，國內學者已由甘藷選殖出胰蛋白酶抑制基因，在菸草表達此基因可有效抗蟲，本研究應用此基因轉殖入菊花期能獲得抗蟲品系。

材料與方法

將阿來粉花瓣滅菌後，分別培養0-7天後進行轉殖。挑一重組農桿菌落EHA105或LBA4404/pBIspTi-1（台大植物系葉開溫教授提供），將上述培養不同天數花瓣培植體浸泡於菌液（實驗組）或RM培養液（對照組）30分鐘後，將培植體移至篩選培養基上。待根系發育完整後，即馴化移至土壤中生長。基因確認利用PCR與南方雜交法進行GUS與TIA基因確認，引子序列為GUS：5' atgta cgtcctgtag aaacc 3' and 5'-tcatt gtttcctcc ctgct gc-3'，產生1.8 kb片段；TIA：5'-aattaaacat cattacctc tc-3' and 5'-ggaga attaaacaa acaca g-3'，產生0.63kb片段。利用PCR片段於3'端進行DIG-dUTP（Roche Biochemicals）螢光標誌，依照說明製成探針並採用化學呈色法呈色。抗蟲試驗使用斜紋葉盜蟲（*Spodoptera litura*），取15隻3齡幼蟲置於剛展開葉片上共四重複，在25°C下培養四天後計算蟲體重量及致死率。

結果與討論

菊花花瓣培植體不經預培養，直接以農桿菌感染並使用抗生素篩選時，所有培植體均因不耐抗生素篩選而死亡。然而若增加預培養的天數，使培植體產生癒合組織之後再進行篩選則可以提高癒合組織與芽體之再生比例。

以此擬轉殖品系進一步繁殖並進行抗蟲試驗，可發現幼蟲進食擬轉殖植株後較為噪動，平均體重顯著低於對照組約10-30%，致死率也較高（ $P < 0.1$ ）。前人研究曾報導菸草轉殖蛋白酶抑制基因可造成蟲體約20-40%體重下降，在菊花可能因為基因組較大因此基因表現未若菸草明顯，若以較強的啟動子驅動本基因其效果可能會更顯著。同時，本基因為植物所演化天然抗蟲機制的一環，可研究其作為病蟲害整合防禦體系的一環，值得做進一步探討。