

生 物 技 術

農桿菌轉殖芋頭抗線蟲基因在番茄之研究

台灣地處熱帶及亞熱帶地區，線蟲之繁殖及危害更甚於溫帶地區，據估計可能造成得農業損失達12.3%左右，尤其根瘤線蟲(*Meloidogyne* spp.)及包囊線蟲(*Heterodera* spp.)之寄主廣泛，傳播快速，所以本年度取自上年度自芋頭中篩選與抗線蟲有關聯性的 proteinase inhibitor genes (CeCPI)其長度為1,008bp，首先進行蛋白質表現之關聯性，製造GST融合蛋白質，再誘導產生抗体，進行西方墨點(western blots)試驗分析，GST-fusion proteins經0.1M IPTG誘導大量表現後，進行純化，製造出來之GST-fusion proteins大約在分子量55 kDa，純化後之融合蛋白質經特定酵素作用後，純化進行注射兔子以製備抗體。

另進行構築至農桿菌LBA4404，目前已完成將CeCPI基因雙向構築至農桿菌內，前面接上promoter有二種，一為35S promoter，一為del 4 promoter(來自甘藷之sporamin)，而後以農桿菌轉殖法將CeCPI(半胱胺銨酸蛋白抑制基因)轉殖至番茄台南亞蔬六號植株上，以增加其抗線蟲性。首先進行一系列的番茄再生試驗，再

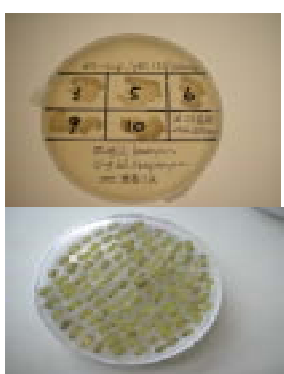
進行番茄農桿菌轉殖法之條件測試。以農桿菌LBA4404內含CeCPI質體單一菌落培養三天後之菌液進行番茄子葉及下胚軸片段之感染及共培養一天或兩天後，再置於再生培養基S1-1或MSG1中經50mg/l hygromycin篩選三週後，觀察培養再生芽體之情形，由於不同番茄品種誘導再生條件及能力並不相同，因此，再生培植體之誘導並不順利，有待進一步之探討。

利用分子生物技術進行十字花科親源鑑定(產學合作)

由於自交不親和基因座之對位基因多達50種以上，而且各基因間尚有顯性或共顯性之交互作用，各個自交不親和基因對自交不親和之表現有不同程度的影響，而且也受環境影響造成自交親和。在台灣地處熱帶地區，欲誘導測試品種系開花必需給予春化處理，此外，為維持測交品系必須利用蕾期授粉保存，因此使用傳統的測交檢定自交不親和基因相當費工費時，Brace et al. (1994)利用6種限制酶分解PCR產物得到的限制酶圖譜，可成功的檢定出48種自交不親和基因，因此，利用PCR-RFLP(polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism)方法應用於十字花科

之花椰菜作物中，使用的引子A序列為5'-AGAACACTTGTATCTCC CCGGT-3'，引子B序列為5'-CAATCTGACATAAAGATCTTG-3'。經PCR擴增反應修改為第一循環94℃，3分鐘；之後25個循環為94℃，30秒；58℃，2分鐘；72℃1分鐘30秒，最後72℃，5分鐘。PCR反應物以1.2% Agarose gel 分析，其擴增片段DNA 長度為1100bp。將76測試品系的DNA經

PCR擴增之產物，以六個限制酶分解後的限制酶圖譜（restriction pattern），大致上均能顯示出親本內的純度均一，因此首先建立十字花科花椰菜之親本圖譜後，再進一步進行雜交後代圖譜建立，而後將這些圖譜與資料庫之圖譜比對，以判斷花椰菜自交不親和基因型為同質或異質結合型。



▲將抗線蟲基因轉入農桿菌(pBI 121)之生長情形

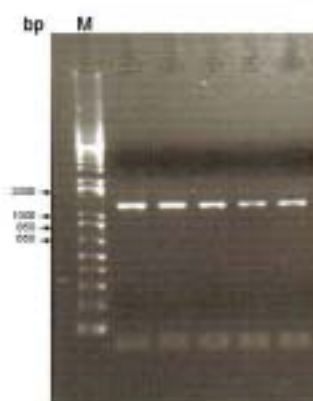


圖1. 以科文引子經PCR反應擴增之花椰菜DNA片段