

番茄‘花蓮亞蔬五號’以農桿菌法轉殖 *Bt* 基因之研究¹

王啟正²、林立³、林學詩⁴

摘 要

為了要以農桿菌法轉殖 *Bt* 基因至番茄‘花蓮亞蔬五號’植株，取 8-10 天苗齡之子葉做為培植體，感染含有 *Cry1AC* 及 *Cry1IC* 載體的農桿菌，以 $O.D_{600}=0.3-0.4$ 或 $O.D_{600}=0.6-0.8$ 兩種感染菌液濃度處理，並進行共培養及再生篩選，結果低濃度菌液感染轉殖處理之再生率 (20.4-34.5%) 較高濃度菌液感染轉殖處理 (13.5-28.2%) 為高。經篩選後僅以含 *Cry1IC* 轉殖再生具有 *Bt* 基因之培植體，低菌液濃度感染處理的 *Bt* 基因再生植株也較多。經南方雜合檢定顯示 3、22 及 22-2 號轉殖株之 *Bt* 基因 (*Cry1IC*) 有 3 個複製數 (copy number)；而 9 及 20 號轉殖株則為 4 個複製數。此 5 株轉殖株經北方雜合檢定皆有 *Bt* 基因表達。餵食斜紋夜蛾幼蟲生物檢定結果顯示 3、20 及 22 號轉殖株抗蟲力較佳，斜紋夜蛾幼蟲對其葉片之取食率分別為 14.2%、14.6% 及 19.8%，小於對照組 (92.4%)，未來可作為抗蟲品種的材料。

(關鍵詞：番茄、*Bt* 基因、基因轉殖)

1.行政院農業委員會花蓮區農業改良場研究報告第 243 號
2.行政院農業委員會花蓮區農業改良場作物改良課助理研究員
3.行政院農業委員會花蓮區農業改良場作物環境課助理研究員
4.行政院農業委員會台中區農業改良場場長

前 言

番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill) 在 2013 年栽培面積達 5,634 公頃 (102 年農業統計年報)，為台灣大宗之果菜類作物。然而番茄病蟲害猖獗，有青枯病、疫病、萎凋病、病毒病等病害及番茄夜蛾、甜菜夜蛾、番茄斑潛蠅等蟲害 (陳等人, 1997)。為了減少番茄蟲害及殺蟲劑使用量，育成抗蟲品種為基本解決之道，番茄種原內並沒有真正抗番茄夜蛾等鱗翅目害蟲的品系 (Usman *et al.*, 2013)，無法以傳統雜交育種的方式育成抗蟲品種，因此欲導入抗蟲性狀有賴基因轉殖法一途。

將農作物轉殖來自蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis*) 的殺蟲蛋白基因 (*Bt* 基因) 被認為是對環境友好的蟲害管理策略 (Kumar *et al.*, 2008)，2010 年全世界的基因改造作物已經種植了約 14,800 萬公頃，其中 *Bt* 基因改造作物種植了約 2,630 萬公頃，為目前抗蟲基因轉殖最常用的基因 (Clive, 2010)。將 *Bt* 基因成功轉殖番茄始於 1987 年 (Fischhoff *et al.*, 1987)，美國 USDA-APHIS 接著在 1987-1988 年間也允許其在田間試驗 (Delannay *et al.*, 1989)，美國 EPA 直到 1998 年允許了 *Bt* 基因轉殖番茄上市 (Sanahuja *et al.*, 2011)。番茄品種‘花蓮亞蔬五號’係本場選育之番茄品種 (曾 1991)，為少數適合夏季種植番茄品種之一，具有耐熱、抗番茄嵌紋病毒及青枯病之優點，推廣後頗受農民歡迎，但因不具抗蟲性，在栽培上仍須耗費大量蟲害防治成本及殺蟲劑使用量，至今仍未見抗蟲基因轉殖相關之報告，因此本研究利用已經建立的番茄基因轉殖系統 (王和林 2007)，嘗試將 *Bt* 抗蟲基因導入‘花蓮亞蔬五號’番茄中。

材料與方法

一、植物培植體材料

取‘花蓮亞蔬五號’番茄種子無菌播種於 1/2MS (半量 MS 元素及維生素，sucrose 30 g/L，pH=5.7，Agar 8.5 g/L) 培養基上，置於光照 3600±200 lux，16 hr/day，溫度 25±2℃ 環境下，8-10 天後將番茄每片子葉切成兩段長約 0.2 cm 左右之片段，供作感染農桿菌材料。

二、農桿菌系及質體構築與保存

將含有蘇力菌基因 *Cry1AC* 及 *Cry1IC* 之雙偶型載體 pBI121 經由電穿孔法轉型進入於農桿菌菌系 LBA4404 中 (材料由中興大學陳良築教授提供)。此質體含有蘇力菌基因聯結花椰菜嵌紋病毒 (CaMV) 之 35S 啟動子及 *Nopaline synthase* 終止子 (NOS terminator)，另含有 *NPT II* 基因可使轉殖植物抗 kanamycin。

三、植物基因轉殖方法

實驗步驟參照王和林 (2007) 之方法，將 MSG0I 感染培養基 (MS 元素+B5 配方維生素+zeatin 1mg/L+sucrose 20g/L+ acetosyringone 400 μ M+Glucose 10g/L，pH=5.2) 與農桿菌菌液沈澱物混合均勻後稀釋至 O.D.₆₀₀ = 0.3-0.4 或 0.6-0.8。將番茄‘花蓮亞蔬五號’子葉切段分別浸泡兩種菌液濃度的 MSG0I 培養基中 30 min 後，再移至共同培養基 (MS 元素+B5 配方維生素+sucrose 20g/L+ acetosyringone 400 μ M+zeatin 1mg/mL+Timentin 150mg/L+Agar 8.5g/L，pH=5.2) 共同培養兩天，再移至再生培養基 (MS 元素+ B5 配方維生素+ sucrose 20g/L+zeatin 1mg/mL+ Timentin 150mg/L，Agar 8.5g/L，pH=5.7) 植株再生後移至 MSTK (MS 元素+ B5 配方維生素+ sucrose 30g/L+ kanamycin 50mg/L+ Timentin 150mg/L，Agar 8.5g/L，pH=5.7) 培養基繼代培養。有芽體再生時即取微量組織進行 PCR 檢測，續以 MSTK 培養基篩選生根，生根後的再生植株為擬轉殖株。對照組 (Wild type) 為番茄‘花蓮亞蔬五號’子葉切段經組織培養

再生之植株，以上植株移至隔離溫室以 14 吋 (43.9cm) 盆種植。植株開花著果後，抽取植株葉片之 DNA、RNA，進行 PCR 及南方、北方雜合檢測及生物檢測。

四、DNA 及 RNA 抽取

植株之葉片樣本均以液態氮降溫磨碎後再進行 DNA 及 RNA 抽取，微量 DNA 以 DNeasy Plant kit (Qiagen) 抽取 DNA，抽取大量 DNA 採用 Murray 及 Thompson (1980) 以 CTAB 緩衝液抽取的方式，RNA 則是以 PineTree 方式 (Chang *et al.*, 1993) 抽取，純化之 DNA、RNA 經測定 A260/A280 ratio 確認比值，DNA 在 1.7-2.0 之間，RNA 在 1.9-2.1 之間為品質良好，DNA 及 RNA 分別經 Agarose 電泳及 formaldehyde denature agarose 電泳確認條帶無誤後，分別置於 -20℃ 及 -80℃ 中保存以進行 PCR 檢測及南方、北方雜合分析。

五、PCR 檢測

設計蘇力菌蛋白基因 *Cry1AC* 及 *Cry1IC* 之 PCR 引子：

CryAC-F : 5' -CAACAACATCTGTTCTTGACGGGACA-3'

CryAC-R : 5' -CTTGATTGTAGATTATCTAATGACGTAGCTGTAGCT-3'

CryIC-F : 5' -CCTTTGGTGATTTTGTATCTCTACAAGTCAA-3'

CryIC-R : 5' -GAGGTTGTTCACTTATCCCAATTATATCTGGA-3'

進行聚合酶連鎖反應 (PCR)，每樣本反應總體積為 20 μ l，內含一組兩個 10 μ M 引子 0.6 μ l，番茄 DNA 0.1 μ g，2.5 mM dNTP 4 μ l、PCR 10X buffer 2 μ l、Taq DNA Polymerase 1 unit，以 PCR 反應器 9700 (ABI 公司，美國) 進行 PCR 反應。反應步驟為：起始變性溫度為 94℃ 5 min；變性溫度 94℃ 40 sec，煉合溫度 55℃ 40 sec，延展溫度 72℃ 40 sec，循環 35 週期；最後延展溫度 72℃ 7 min。取 10 μ l PCR 產物與 2 μ l 6X Loading Dye 混合，注入於含 1.5% (w/v) agarose 及 1 倍 SYBER SAFE (Invitrogen 公司，美國) 之 1 X TAE 緩衝液膠體，在 100 V 電壓下進行電泳解析，25 min 後取出膠體，置於紫外燈下觀察結果。

六、南方式雜合檢測

擬轉殖番茄及對照植株葉片 DNA 20 μ g 分別以三種限制酵素 *Ava*I、*Nco*I 及 *Eco*RI 酶切 16 hr 後，分別注入 1% (w/v) agarose 之 1 X TAE 緩衝液膠體，電泳 14 V 20 hr 後，進行轉漬，參照王和林 (2007) 之實驗步驟。

雜合前製成 DIG 探針，利用 DIG 探針製作套組 (Roche 公司)，利用已確定序列之 *Bt* 基因 DNA 當作模板，以 PCR 的方式將 DIG-dUTP 結合在 DNA 探針上，探針製作完成後可貯存於 -20℃ 保存。

將轉漬膜與預雜合緩衝液放置於雜合管中，再置於雜合箱中 42℃ 預雜合反應 1 hr，雜合前取 2 μ l 探針與 8 μ l 無菌水混合，經 100℃ 5 min 將 DNA 探針雙股分開，再置於冰上 5 min。預雜合反應完畢後將預雜合緩衝液倒掉，再加入含有已分開雙股的探針雜合之緩衝液，在 42℃ 中雜合反應隔夜，第二天取出轉漬膜於室溫下以 2X SSPE 緩衝液+0.1%SDS 溶液 60 rpm 震盪清洗 10 min 2 次，再置於 65℃ 下 0.5X SSPE 緩衝液+0.1%SDS 溶液震盪清洗 15 min 2 次。再按照 Roche 公司出版的 DIG 應用步驟，經清洗、blocking、與抗體結合、清洗兩次後以 CDP-STAR 與抗體反應，與探針結合之 DNA 條帶反應後會放出化學冷光，冷光顯影結果以 LAS4000 冷光照像機 (富士公司，日本) 紀錄。

七、北方雜合檢測

取番茄葉片 RNA 20 μ g 以含 1% (w/v) agarose (含 formaldehyde) 於 MOP 緩衝溶液中以 50 V 電泳分離 1 hr 後，放入 20X SSC 緩衝液平衡 15 min 2 次，再進行轉漬之後之實驗（如南方雜合步驟），但雜合條件為 50°C 反應隔夜。

八、供試昆蟲飼養及生物檢定

自花蓮縣吉安鄉採集斜紋夜蛾 (*Spodoptera litura*) 幼蟲，將之飼養於 27°C，光週期為 12 hr 照明，12 hr 黑暗之生長箱。1-2 齡幼蟲飼養於直徑 9 cm、高 5.5 cm 之塑膠容器中，並餵以人工飼料 (Flowering bean 150g/L, Yeast powder 60g/L, Wheat germ 55g/L, L-Cysteine 0.6g/L, L-Ascorbic acid 6g/L, Sorbic acid 1.5g/L, Methyl-p-hydroxybenzoate 1.75g/L, Formalin 24% 3ml/L, Agar 37.5g/L)。3 齡後的幼蟲因具自殘性，故分開飼養於 30 孔盤中。成蟲則置於直徑 20 cm、高 30 cm 之透明壓克力圓柱筒中，內襯擦手紙巾，並置糖水供成蟲吸食，約 5 天後採卵供繼代用。本試驗採用繼代後之斜紋夜蛾二齡幼蟲作為供試昆蟲。

選擇轉殖植株、只轉殖載體的轉殖株 (Vector control) 及沒有轉殖的植株 (Wild type) 成熟度相同的葉片，Vector control 與 Wild type 為對照組，取下前面 3 片小葉，小葉前端插入含水之 2.0 ml 平蓋離心管中以防失水，再放入透氣透明的塑膠盒子中，每個透明盒子放入 10 隻斜紋夜蛾二齡幼蟲，每一個轉殖株共 5 盒作為重複，定時計算幼蟲啃食過之葉面積，與取食前之總葉面積相比後，換算為取食率。另外並於餵食試驗過程中每天記錄幼蟲死亡隻數，將其換算為死亡率。觀察未經農桿菌轉殖之對照組之取食情形，等到對照組大部分被幼蟲取食完畢時即停止實驗，取出葉片及蟲體攝影及記錄。

結 果

番茄子葉經過兩種菌液濃度浸漬 30 min 後，經過共培養及篩選再生後，估算培植體的再生率，以 O.D.₆₀₀=0.3-0.4 處理者再生率 (20.4 及 34.5%) 較高、O.D.₆₀₀=0.6-0.8 處理者再生率 (13.5 及 28.2%) 較低。轉殖 *CryIC* 載體再生率較高 (28.2 及 34.5%)。經過第五次抗生素篩選後陽性株數目 (5-8 株) 較多，轉殖 *CryIC* 載體再生率較高 (28.2 及 34.5%)，經過第五次抗生素篩選後其 PCR 檢測陽性株數目 (5 及 8 株) 較多，轉殖 *CryAC* 載體再生率較低 (13.5 及 20.4%)，經過第五次抗生素篩選後則無 PCR 檢測陽性株 (表一)。以再生植株數目代表轉殖效率，番茄基因轉殖時之農桿菌濃度會影響轉殖效率，如表一之 O.D.₆₀₀=0.3-0.4 處理者再生率較高。

表一、菌液濃度、Cry 基因種類對‘花蓮亞蔬五號’番茄以農桿菌轉殖之影響

Table 1. Effect of bacterial concentration and Cry gene on the transformation efficiency of tomato cultivar ‘Hualien AVRDC 5’.

Bacterial Conc.(O.D.)	Gene	Regenerated Explants (%)	Bt positive ^z	
			2 nd sel. ^y (%)	5 th sel. ^y (%)
0.3-0.4	<i>CryIAC</i>	20.4±6.4	0/3 (0%)	0/0 (0%)
0.3-0.4	<i>CryIIC</i>	34.5±10.3	21/33 (63.6%)	8/25 (32.0%)
0.6-0.8	<i>CryIAC</i>	13.5±5.4	0 ^x /2 ^w (0%)	0/0 (0%)
0.6-0.8	<i>CryIIC</i>	28.2±8.9	16/28 (57.1%)	5/19 (26.3%)

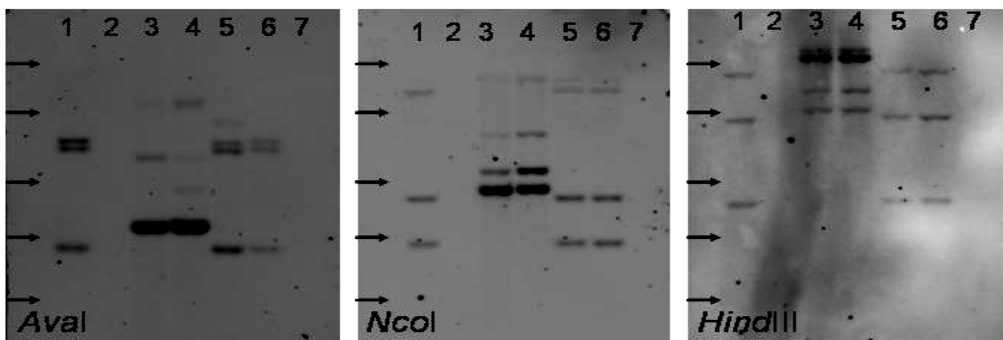
^z positive reaction according to PCR analysis with Bt gene specific primers.

^y the explants number after the 2nd and 5th kanamycin selection.

^x the shoots number which is Bt positive for PCR analysis.

^w the shoots number for PCR analysis.

帶根的擬轉植株持續在含抗生素的 MS 培養基中以微體扦插法繁殖，共有 6 個擬轉植株，抽取葉片 DNA 後，分別以 *Hind*III、*Ava*I、*Nco*I 三種限制酶酶切，經電泳分離後將 DNA 條帶轉漬 (transfer) 到帶正電的轉漬膜上，經過與 DIG 探針雜合反應及顯影，南方雜合反應之條帶如圖一，轉植株 4 號在 3 種酶切的南方雜合試驗顯示都沒有呈色條帶 (圖一)，表示其染色體組中沒有蘇力菌蛋白基因轉殖在其中，而轉植株 3、22 及 22-2 號以相同的限制酵素酶切電泳經探針雜合的條帶數及條帶大小 (電泳呈色條帶位置) 皆相近，表示可能 3、22 及 22-2 號轉植株之 *Bt* 基因應該插入番茄染色體同一個位置上，所插入的蘇力菌蛋白基因有 3 個複製數；而 9 及 20 號轉植株所插入的蘇力菌蛋白基因有 4 個複製數，其中 9 號轉植株以 *Ava*I 酶切之南方雜合圖顯示 2.8 Kb 的條帶較淡，但由 *Hind*III、*Nco*I 酶切之南方雜合圖皆為 4 條條帶，且與轉植株 20 號酶切的電泳條帶形式相同，故 9 及 20 號轉植株的 *Bt* 基因很可能插入番茄染色體同一個位置上，此兩者插入位置相同可視為同一個的轉殖品項 (event)。而對照組 (Wild type) 並沒有呈色條帶出現，表示正常番茄植株並沒有此 *Bt* 基因存在。



圖一、番茄‘花蓮亞蔬五號’轉殖 *Bt* 基因植株南方雜合檢定

Fig. 1. Southern blot hybridization analysis of *Bt* gene transferred tomato plants. Lanes 1-6: transgenic tomato lines 3, 4, 9, 20, 22, 22-2, Lane 7: Wild type. Arrows from top to bottom represent the location of 10 Kb, 5 Kb, 3 Kb, 2 Kb, and 1.5 Kb, respectively. Genomic DNA was digested with restriction enzymes *Ava*I, *Nco*I, and *Hind*III, respectively.

北方雜合顯示轉植株 3、9、20、22 及 22-2 號皆有蘇力菌蛋白基因的表達現象，擬轉植株 4 號亦沒有表達，與只轉殖載體的轉植株 (Vector control) 及沒有轉殖的植株 (Wild type) 一樣都沒有表達蘇力菌蛋白基因 (圖二)，因此由南方雜合及北方雜合資料顯示轉植株 3、9、20、22 及 22-2 號確為轉殖植株，且有蘇力菌蛋白基因表達現象。其中以 9 號轉植株表達量較高，但同屬相同的轉殖品項 (event) 的 20 號轉植株及另外的轉殖品項之 3 號轉植株表達量較低。



圖二、番茄抗蟲基因轉殖植株北方雜合檢定

Fig. 2. Northern blot hybridization analysis of *Bt* gene transferred tomato plants. Lanes 1-6: transgenic tomato lines 3, 4, 9, 20, 22, 22-2, V: vector transferred tomato plant, WT: Wild type.

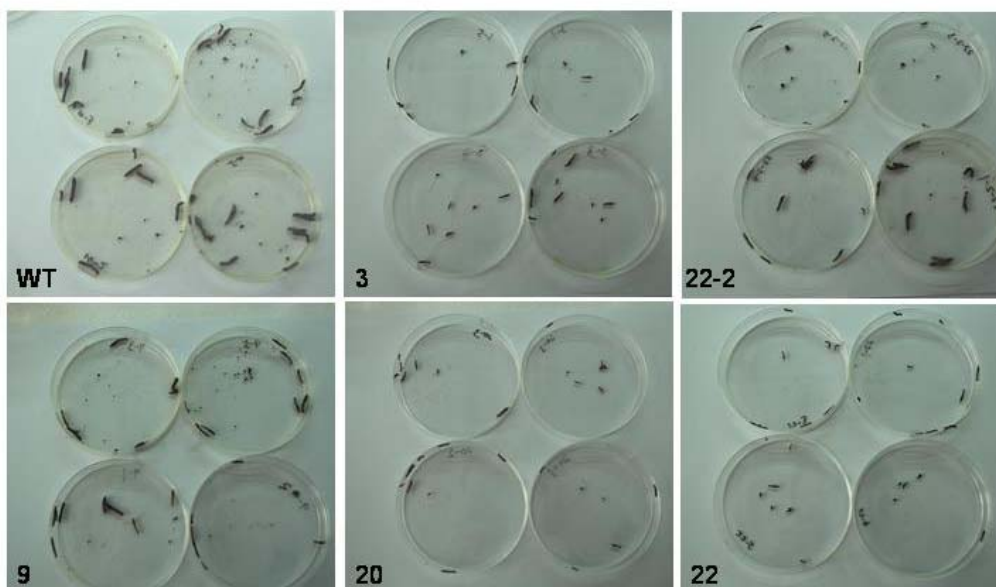
取番茄轉殖株第 3、9、20、22 及 22-2 號及未轉殖植株 (Wild type) 之小葉，分別餵食斜紋夜蛾幼蟲 24 hr 後結果如圖三，第 3、20 及 22 號轉殖株抗蟲力較佳，斜紋夜蛾幼蟲對其葉片之被取食率分別為 14.2%、14.6% 及 19.8%，顯著小於對照組的 92.4%；第 9 號轉殖株抗蟲力較差，被取食率 77.4%，與未轉殖的對照組差異不顯著（表二），能夠順利從 2 齡蛻皮生長至 3 齡個體者，則可繼續生長下去而不會死亡，圖三的葉片被取食情形則與表二相符。

大部分幼蟲食用 *Bt* 基因轉殖株葉片後生長停滯或死亡，僅少數幼蟲生長至 3 齡，其中被取食率較高的第 3、20 及 22 號轉殖株幼蟲死亡率分別為 36.0%、34.0% 及 28.0%，死亡率並不高，存活的蟲體仍維持在二、三齡幼蟲之體型，而 22-2 號轉殖株幼蟲死亡率雖為 40.0%，但變異（標準偏差）較大，且有一部分存活之幼蟲生長到四、五齡。葉片被取食率較高的對照組及第 9 號轉殖株之幼蟲死亡率低，存活的蟲體可生長至二、三齡或四齡幼蟲之體型（表二、圖四）。



圖三、*Bt* 基因轉殖番茄餵食斜紋夜蛾幼蟲 24 hr 後之葉片取食情形

Fig. 3. Feeding test of *Bt* transgenic tomato leaves after 24 hours by armyworm. WT: Wild type; Numbers 3, 9, 20, 22, 22-2: transgenic tomato plants.



圖四、斜紋夜蛾幼蟲取食 *Bt* 基因轉殖番茄株 5 天後之生長情形

Fig. 4. Armyworm developing condition after 5 days fed with *Bt* transgenic tomato leaves. WT: Wild type; Numbers 3, 9, 20, 22, 22-2: transgenic tomato plants.

表二、以 *Bt* 基因轉殖番茄葉片餵食斜紋夜蛾幼蟲之葉片被取食率和幼蟲死亡率

Table 2. Consumption rate and mortality of armyworm fed with *Bt* transgenic tomato leaves.

轉殖株 No. of <i>Bt</i> transgenic plant	葉片被取食率 (%) ^y Consumption rate	斜紋夜蛾幼蟲死亡率 (%) Mortality
3	14.2±13.6	36.0±17.4
9	77.4±15.3	10.0± 8.9
20	14.6±12.4	34.0±24.2
22	19.8±13.4	28.0±14.7
22-2	25.4±20.5	40.0±27.6
Wild type ^z	92.4± 7.0	2.0± 4.1

^zNon-transgenic plant as control.

^yThree leaflets per repeat and five repeats were investigated in the bioassay.

討 論

影響農桿菌轉殖效率有很多因素，除了組織培養條件之外，農桿菌感染植物培植體的濃度非常重要，一般認為以農桿菌轉殖番茄基因時最適合濃度為 O.D.₆₀₀ 約為 0.4-0.8 (Fillatti *et al.*, 1987; Frary and Earle, 1996)·Ellu 等人 (2003) 也將共培養菌液濃度減少到每毫升有 102-103 個農桿菌 (O.D.₆₆₀ = 0.1-0.15)，可使番茄品種 p73 的轉殖效率從 2.5% 提高到 11.2%。王和林 (2007) 試驗結果顯示以 O.D.₆₀₀ = 0.8-1.0 菌液濃度轉殖效率較 O.D.₆₀₀ = 0.6-0.8 處理者差，Gao 等人 (2009) 養菌養到 O.D.₆₀₀ = 1.0 再稀釋至 0.1 後感染番茄時轉殖效率較佳，與本研究結果相符 (表一)，因此在感染培植體時將農桿菌稀釋至較低的濃度將可增加轉殖效率。

此外影響轉殖效率的因子尚包括所構築的載體及基因，本研究結果顯示轉殖 *CryIAC*、*CryIIIC* 載體之再生植株在第 1 次篩選時有 7 及 16 個、33 及 41 個通過抗生素篩選 (資料未顯示)，在第 2 次篩選後擬轉殖植株分別僅剩 2 及 3 株及 28 及 33 株，其中轉殖 *CryIAC* 基因之再生植株共 5 株，*Bt* 基因偵測結果皆為陰性，而轉殖 *CryIIIC* 基因者亦有 42.9 及 36.4% 為陰性 (表一)，表示仍有許多再生植株雖然通過抗生素篩選但為假陽性，這些再生植株多半在轉換到含抗生素生根培養基便會白化死亡。Cheng 等人 (1998) 利用不同的載體分別轉殖 *CryIA(b)* 及 *CryIA(c)* 基因進入水稻中，結果顯示從不同的癒傷組織再生轉殖植株的比例不同，不同的載體亦有相當的差異，在轉殖過程中甚至有少許報導基因與 *Bt* 基因分離的現象，因此表一所出現的假陽性現象植株有少部分有可能是在轉殖過程中 *NPTII* 基因與 *Bt* 基因分離所造成的現象。而轉殖 *CryIAC* 基因處理最後沒有獲得轉殖株，可能是不同載體構築所造成的影響。

蘇力菌蛋白基因並沒有轉殖進入番茄染色體組中 (圖一)，但其擬轉殖植株其在含抗生素培養基能繼代培養並能正常生根，或許是在轉殖過程中抗抗生素基因 *NPTII* 因為不明原因與蘇力菌蛋白基因分離，如同 Cheng 等人 (1998) 在水稻轉殖 *Bt* 基因的實驗結果顯示有些轉殖植株僅有篩選基因轉入植株中，也或許是 4 號轉殖株在組織培養過程中對 kanamycin 不敏感所致，因本研究並沒有針對 *NPTII* 基因進行分析檢測，無法確定其原因。

前人研究中轉殖蘇力菌毒蛋白基因至水稻 (Cheng *et al.*, 1998)、結球白菜 (Xiang *et al.*, 2000)、花椰菜 (Chakrabarty *et al.*, 2002) 及番茄 (Gao *et al.*, 2009) 之轉殖株分別有 1-3 個複製數，而 3 個複製數的轉殖株數目都較少，Zaidi 等人 (2005) 使用含葉片專一性啟動子及 *Bt* 基因轉殖菸草，則有 1-8 個複製數，8 個複製數在基因轉殖研究中較少見，可能是載體種類影響所致，本研究之番茄轉殖株為 3 或 4 個複製數，較前述的基因轉殖實驗轉殖株複製數較多，其原因有待進一步探討。

許多研究認為基因表達量與複製數無關 (Zaidi *et al.*, 2005)，與插入位置及植株個體有關 (Mlynarova *et al.*, 1995; Meza *et al.*, 2002)，可能為同屬相同的轉殖品項的 20 號與 9 號轉殖株 *Bt* 基因表達量不一致之原因 (圖二)，而本試驗係採取第四片葉之頂端小葉為抽取樣本，也可能因為生理年齡不一致而影響到基因表達量。

本研究中大部分幼蟲生長停滯或死亡主要原因可能為拒食所致，這與文獻曾指出蘇力菌對於昆蟲會引起拒食現象的說法相符 (Berdegue *et al.* 1996; Farrar and Ridgway, 1995)，斜紋夜盜蟲幼蟲餵食蘇力菌蛋白基因轉殖株 3 號、20 號及 22 號後死亡率則分別為 36.0、34.0 和 28.0%，明顯高於對照組的 2.0% (表二) 顯示這些拒食的幼蟲在試驗期間因拒食缺乏營養而死亡。有些幼蟲在餵食 *Bt* 基因轉殖植株能夠順利從 2 齡脫皮生長至 3 齡個體者 (圖四)，則可繼續生長而不會死亡原因可能為蟲體對蘇力菌蛋白的敏感程度會隨著齡期增加而減小 (González-Cabrera *et al.*, 2010)。

由表二顯示斜紋夜蛾幼蟲取食率以對照組及轉殖株 9 號最高，死亡率也相對較低，推測這二個轉殖株對於斜紋夜蛾幼蟲較不具抗性。另外本試驗過程當中，由於在幼蟲餵食試驗進行前並未讓同一批剛蛻皮的二齡幼蟲飢餓數小時，可能造成整個齡期當中因先餵食人工飼料而相對減少之後的供試葉片攝取

量，導致取食差異甚大，間接造成體內取食到蘇力菌蛋白的多寡，這或許也可解釋表中標準差普遍較高的原因。建議以後進行類似實驗時，可進一步針對斜紋夜蛾幼蟲先予以秤重並計算增重率，進行長期和短期餵食分析，以探討幼蟲之生長表現。

結 論

本研究結果獲得 6 個 *Bt* 基因轉殖株，其中轉殖株 3、20 及 22 號抗蟲力較佳，可減少斜紋夜蛾幼蟲的取食率並且增加其死亡率，此 3 個轉殖株未來可以營養繁殖作為抗蟲植株的品種或作為抗蟲育種親本之用。

致 謝

本文承蒙台灣大學林順福教授、屏東大學陳福旗教授及本場蘭陽分場長陳吉村博士斧正，本場蔡嘉欣、呂昱臻、邱楹縈及林沛儀小姐協助實驗，使本文得以完成，謹此致謝。

參考文獻

1. 王啟正、林學詩 2007 花蓮亞蔬五號番茄農桿菌基因轉殖系統之建立 花蓮區農業改良場研究彙報 25:37-52。
2. 曾喜一 1991 番茄新品種花蓮亞蔬 5 號之育成及其特性 花蓮區農業改良場研究彙報 7:113-125。
3. 陳文雄、鄭安秀、王添成 1997 番茄病蟲害綜合防治 蔬菜病蟲害綜合防治專輯 果 1-18 行政院農業委員會彙編印
4. Berdegue, M., J.T. Trumble and W.J. Moar. 1996. Effect of *CryIC* toxin from *Bacillus thuringiensis* on larval feeding behavior of *Spodoptera exigua*. *Entomol. Exp. Appl.* 80:389-401.
5. Chakrabarty, R., N. Viswakarma, S.R. Bhat, P.B. Kirti, B.D. Singh and V.L. Chopra. 2002. *Agrobacterium*-mediated transformation of cauliflower: optimization of protocol and development of *Bt*-transgenic cauliflower. *J. Biosci.* 27:495-502.
6. Chang, S., J. Puryear and J. Cairney 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11: 113-116.
7. Cheng, X., R. Sardana, H. Kaplan and I. Altosaar. 1998. *Agrobacterium*-transformed rice plants expressing synthetic *cryIA(b)* and *cryIA(c)* genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 2767-2772.
8. Clive, J. 2010. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2010. ISAAA Brief No. 42. ISAAA: Ithaca, NY.
9. Delannay, X., B.J. La Vallee, R.K. Proksch, R.L. Fuchs, S.R. Sims, J.T. Greenplate, P.G. Marrone, R.B. Dodson, J.J. Augustine, J.G. Layton and D.A. Fischhoff. 1989. Field performance of transgenic tomato plants expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* insect control protein. *Bio/Technology* 7:1125-1269.
10. Ellu, P., B.S. Garcia, B. Pineda, G. Rios, L.A. Roig and V. Moreno. 2003. The ploidy level of transgenic plants in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato cotyledons (*Lycopersicon esculentum*) is genotype and procedure dependent. *Theor. Appl. Genet.* 106: 231-238.
11. Farrar, R.R. and R.L. Ridgway. 1995. Feeding behavior of gypsy moth (*Lepidoptera: Lymantriidae*) larvae on artificial diet Containing *Bacillus thuringiensis*. *Environ. Entomol.* 24(3):755-761.
12. Fillatti, J.J., J. Kister, R. Rose, and L. Comai. 1987. Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. *Bio/Technology* 5: 726-730.
13. Fischhoff, D.A., K.S. Bowdish, F.J. Perlak, P.G. Marrone, S.M. McCormick, J.G. Niedermeyer, D.A. Dean, K.K. Kretzmer, E.J. Mayer, D.E. Rochester, S.G. Rogers and R.T. Fraley. 1987. Insect tolerant transgenic tomato plant. *Bio/Technology* 5:807-813.
14. Frary, A. and E.D. Earle. 1996. An examination of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato. *Plant Cell Rep.* 16: 235-240.
15. Gao, N., W. Shen, Y. Cao, Y. Su and W. Shi. 2009. Influence of bacterial density during preculture on *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 98:321-330.
16. González-Cabrera, J. O. Mollá and H.M.A. Urbaneja. 2010. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) in controlling the tomato borer, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *BioControl* 56(1):71-80.
17. Kumar, S., A. Chandra and K.C. Pandey. 2008. *Bt* transgenic crop: An environment friendly insect-pest management strategy. *J. Environ. Curr. Sci.* 91:930-934.
18. Meza, T.J., B. Stangeland, I.S. Mercy, M. Skarn, D.A. Nymoen and A. Berg. 2002. Analyses of single-copy *Arabidopsis* T-DNA-transformed lines show that the presence of vector backbone sequences, short inverted repeats and DNA methylation is not sufficient or necessary for the induction of transgene silencing. *Nucl. Acids Res.* 30:4556-4566.
19. Mlynarova, L., R.C. Jansen, A.J. Conner, W. J. Stiekema and J.P. Nap. 1995. The MAR-mediated reduction in position effect can be uncoupled from copy number-dependent expression in transgenic plants. *Plant Cell* 7:599-609.
20. Murray, M.G. and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.* 8:4321-4325.

21. Sanahuja, G., R. Banakar, R.M. Twyman, T. Capell and P. Christou. 2011. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. Plant Biotechnol. J. 9:283-300.
22. Usman, A., I. A. Khan, M. Inayatullah, A. U. R. Saljoqi and M. Shah. 2013. Appraisal of different tomato genotypes against tomato fruit worm (*Helicoverpa armigera* hub.) Infestation. Pakistan J. Zool. 45:113-119.
23. Xiang, Y., W.K.R. Wong, M.C. Ma and R.S.C. Wong. 2000. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brassica campestris* ssp. *Parachinensis* with synthetic *Bacillus thuringiensis* *cry1Ab* and *cry1Ac* genes. Plant Cell Rep. 19:251-256.
24. Zaidi, M.A., M. Mohammadi, S. Postel, L. Masson and I. Altosaar. 2005. The *Bt* gene *cry2Aa2* driven by a tissue specific ST-LS1 promoter from potato effectively controls *Heliothis virescens*. Transgenic Res. 14:289-298.

Studies on the *Bt* Genes Transformation by *Agrobacterium* Mediated Transformation for Tomato ‘Hualien ADRVC No. 5’¹

Chii-Jeng Wang² Li Lin³ Hsueh-Shih Lin⁴

Abstract

To transfer *Bt* genes into tomato cultivar ‘Hualien AVRDC No. 5’ mediated by *Agrobacterium*, the 8-10 days old cotyledons of tomato were used as explants and infected with *Agrobacterium* carrying *Cry1AC* or *Cry1IC*. The explants were infected with two bacterical densities ($O.D_{600}=0.3-0.4$ or $O.D_{600}=0.6-0.8$) and then cocultured and regenerated. The regeneration efficiency in the lower bacteria density treatment was higher (20.4-34.5%) than the higher bacteria density treatment (13.5-28.2%), and *Bt* genes positive plantlets were obtained if the explants infected with lower bacteria density. Transgenic plants 3, 22, and 22-2 contain three *Bt* (*Cry1IC*) copies and transgenic plants 9 and 20 with four *Bt* copies as confirmed by Southern blot analysis. *Bt* genes were expressed in five transgenic plants proofed by northern blot analysis. Transgenic plants 3, 20 and 22 had higher resistance for armyworm according to bioassay data. The leaf consumption rates (14.2%, 14.6% and 19.8%) were lower than wild types. Those transgenic plants with insect resistance may be served as the breeding materials in the future.

Key words: tomato, *Bt* genes, gene transformation.

1. Research article No.243 of Hualien District Agricultural Research and Extension Station.
2. Assistant researcher, Crop Improvement Section, Hualien DARES.
3. Assistant researcher, Crop Improvement Section, Hualien DARES.
4. Director, Taichung District Agricultural Research and Extension Station.