

# 花蓮亞蔬五號番茄農桿菌基因轉殖系統之建立<sup>1</sup>

王啓正<sup>2</sup> 林學詩<sup>3</sup>

## 摘要

爲了建立花蓮亞蔬五號番茄之基因轉殖系統，以 8-10 天苗齡之子葉及下胚軸切段做爲培植體，結果顯示以 BA5、S1-1 及 MSG1 培養基再生芽體較多，培養基添加 Timentin 150mg/L 之芽體再生率與不添加處理沒有顯著差異。以農桿菌 LBA4404 菌系內含 PBI121 之質體作爲轉殖之載體，以感染菌液濃度 O.D.600 爲 0.6-0.8，與培植體浸泡 30 分鐘，共培養時間爲 2 天，共同培養基之 AS 濃度以 200-400 $\mu$ M 較佳。另以再生培養基 B5 (內含 BA 5 mg/L)、S1-1 (內含 kinetin 2mg/L, NAA 0.02mg/L) 及 MSG1 (內含 zeatin 1mg/L) 配合不同抗生素篩選方法誘導植株再生，每培植體平均再生芽數爲 1.5-3.4 個，以 MSG1 培養基之篩選後再生率較高，先以低濃度抗生素篩選再以高濃度抗生素篩選可獲得 GUS 基因全株表達之植株，並已經由 PCR 檢測及南方雜交檢測確定之。目前正利用此技術轉殖 Bt 基因試驗。

(關鍵詞：番茄、再生、農桿菌、基因轉殖)

## 前言

台灣番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill) 種植面積已達 4762 公頃，產量高達 118 千公噸 (94 年農業統計年報)，爲台灣大宗之果菜類作物。然夏季番茄病蟲害猖獗，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。番茄品種花蓮亞蔬五號係本場命名之番茄品種 (曾 1991)，爲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，欲在短期內導入抗病蟲性狀而保持作物其他的性狀，唯有仰賴基因轉殖法一途。

番茄相較於菸草與矮牽牛，爲基因轉殖較不穩定之茄科作物，如何建立穩定且效率高的番茄農桿菌媒介法轉殖體系是個重要的課題。若能利用基因轉殖法將抗蟲基因導入花蓮亞蔬五號，將使本品種更臻理想，不僅可節省栽培成本，還可減輕農藥之危害，本研究嘗試針對花蓮亞蔬五號番茄建立一套穩定且效率高的農桿菌法基因轉殖體系，以應用在抗蟲基因轉殖之研究。

---

1. 行政院農業委員會花蓮區農業改良場研究報告第 203 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研究員兼秘書

## 材料與方法

### 一、植物培植體材料

取花蓮亞蔬五號番茄種子浸漬於含 3 滴 tween 20 之 1% 次氯酸鈉溶液，超音波震盪消毒 10 分鐘後，以無菌水清洗三次，於無菌操作台中平置於 1/2MS (半量 MS 元素及維生素，sucrose 30g/L, pH=5.7, Agar 8.5g/L) 培養基上，瓶口用鋁箔及石蠟膜封好並置於光照 3600±200 lux, 16hr/day, 溫度 24±2 環境下，8-10 天後將番茄下胚軸切成 0.5 公分左右，每片子葉則切成兩段長約 0.2 公分左右之片段，背面朝上平置於培養基上。

### 二、生長調節劑組合試驗

以 MSB5 培養基 (MS salt + B5 Vit., Sucrose 30g/L, pH=5.7, Agar 8.5 g/L) 為基礎，添加不同濃度之 cytokinin 類植物生長調節劑，如 kinitin, zeatin, BA, 與 auxin 類之 NAA 組合，調整成再生培養基，觀察生長調節劑對番茄培植體的影響。選擇再生芽數較多之再生培養基加入 Timentin 150mg/L, 觀察培養基加入 Timentin 對番茄培植體再生之影響。於第 4、5、6 週調查再生率及再生芽體數，其中再生率為每盤培養基中有再生芽體之培植體比率，再生芽體數為每培植體之平均再生芽體數。

### 三、農桿菌系及質體構築與保存

雙偶型載體 PBI121 (Clontech Co. USA) 經由電穿孔法轉型進入於農桿菌系 LBA4404 中。此質體含有 GUS ( $\beta$ -glucuronidase) 基因聯結花椰菜嵌紋病毒 (CaMV) 35S 啟動子及 nopaline synthase 終止子 (NOS terminator)，另含有 NPT II 基因可抗 kanamycin。農桿菌轉型後，利用三角玻棒將菌液均勻塗在 LBK (LB + kanamycin 50mg/L) plate 上，轉型成功之農桿菌會在 LBK 培養基中以單一菌落的型態長出，挑取單一菌落經 PCR 分析確認後，以 LBK 液體培養基 5mL 於 28℃ 下震盪培養一天，再以甘油：菌液為 1：2 的比例置於 2mL 之冷凍小管，先於液態氮中急速冷卻，再置於 -80℃ 中長久保存。

### 四、植物基因轉殖方法

農桿菌於 LBK plate 培養基上畫線培養，置於 28℃ 兩天後挑取單一菌落，先以 5mL LBK 液體培養基於 28℃ 下震盪培養一天，再加入內含 25mL LBK 液體培養基之 50mL 螺蓋離心管中，28℃ 震盪培養一天，以轉速 5000rpm 離心 10 分鐘 (HERMLE Z380)，去除上清液，將感染培養基 (如表三) 與菌液沈澱物混合均勻並稀釋至適當濃度 ( $O.D._{600} = 0.6-0.8$  或  $1.0-1.2$ ) 並添加 acetosyringone (AS) 0-400 $\mu$ M (0, 100, 200, 400 $\mu$ M)。

將番茄下胚軸或子葉切段分別浸泡在含有農桿菌之感染培養基 10, 30, 60 分鐘後，再移至含 AS 0-400 $\mu$ M 之共同培養基 (如表三) 上，於黑暗下、22-24℃，共同培養 1、2 或 3 天，共同培養後用 MSB5T5 液體培養基 (MSB5+Timentin 500 mg/L) 清洗三次後，培植體表面用無菌濾紙吸乾後，置於含 Timentin 200 mg/L 及 kanamycin 20-50mg/L 之再生篩選培養基上。

利用抗生素篩選的方法分為三種：一、直接移至含高濃度抗生素 (kanamycin 50mg/L) 再生篩選培養基 (表三、方法 3)。二、先移至不含抗生素之再生培養基兩週後或四週後再移至含抗生素 (kanamycin 50mg/L) 之再生篩選培養基 (表三、方法 1、2)。三、先移至低濃度抗生素 (kanamycin 20mg/L) 培養

基再移至含高濃度抗生素 (kanamycin 50mg/L) 之再生培養基 (表三、方法 4)。

植株再生後移至 MSK5T2 (MSB5 培養基+kanamycin 50mg/L+Timentin 200mg/L) 中繼代培養。確定生根後進行 GUS 化學呈色法及 PCR 檢測，檢測為陽性者移至隔離溫室以 12 吋盆種植。植株成長後取其根、莖、葉、花、果實進行 GUS 化學呈色檢測，同時抽取 DNA，進行 PCR 及南方雜合檢測。

## 五、GUS 化學呈色法檢測

通過抗生素篩選的擬轉殖植株繼代培養時，切取葉片置於適量含 X-Gluc 2mg/mL 的溶液中，溶液為 pH=7.0 的磷酸鈉緩衝液內含 1 mM/L EDTA、1% Triton X-100、0.5 mM/L  $K_3Fe(CN)_6$ 、0.5 mM/L  $K_4Fe(CN)_6$  (Jefferson, 1987)，於 37 °C 下隔夜後，取出葉片再用 95%酒精將葉綠素去除，並以未轉殖之正常番茄葉片進行相同處理作為對照，觀察擬轉殖植株葉片是否呈藍色。

## 六、PCR 檢測

通過抗生素篩選的番茄基因擬轉殖植株以液態氮降溫磨碎後，以 DNeasy Plant kit (Qiagen) 抽取 DNA，純化之 DNA 置於 -20 °C 中保存以進行 PCR 檢測及南方雜合分析。

設計 GUS723 引子 (5'-GGCAAAGTGTGGGTCAATAATCAGG -3'，5'-TTCAGCGTAAGGGTAATGCGAGGT-3') 及 GUS179 引子 (5'-CTTTAACTATGCCGGAATCCAT CG-3'，5'-CCACCTGTTGATCCGCATCACG-3')，進行聚合酶連鎖反應 (PCR)，反應總體積為 20 $\mu$ L，內含一組兩個 10 $\mu$ M 引子 1 $\mu$ L，擬轉殖植株番茄 DNA 0.1 $\mu$ g，2.5mM dNTP 4 $\mu$ L、PCR buffer 2 $\mu$ L、Taq DNA Polymerase 1 unit，填加無菌水至 20  $\mu$ L，以 ABI 公司出品之 PCR 反應器 9700 進行 PCR 反應，負對照組以 PCR 等級去離子水取代 DNA。反應步驟為：起始變性溫度為 94 °C 5 分鐘；變性溫度 94 °C 40 秒，煉合溫度 50 °C，40 秒，延展溫度 72 °C 1 分鐘，循環 35 週期；最後延展溫度 72 °C 7 分鐘。取 10  $\mu$ L PCR 產物與 2  $\mu$ L 6X Loading Dye 混合，注入於含 1.7% (w/v) agarose 及一倍 SYBER SAFE (Invitrogen Co. USA) 之 1 X TAE 緩衝液膠體，在 110 伏特電壓下進行電泳解析，通電 25 分鐘後取出膠體置於紫外燈下觀察結果。

## 七、南方式雜合檢測

取轉殖番茄之 DNA 40 $\mu$ g，分別以三種限制酵素 *Ava*I、*Nco*I、*Eco*RI 酶切 16 小時後，分別注入 1.1% (w/v) agarose 之 1 X TAE 緩衝液膠體，電泳 10 伏特 22-24 小時，再將電泳膠片浸在 0.25N HCl 中 20rpm 震盪 10 分鐘，再浸於 Denaturation 溶液 (0.5M NaOH, 1.5M NaCl) 中震盪 15 分鐘兩次，再浸於 Neutralization 溶液中 (0.5M Tris-HCl, pH 7.5; 1.5M NaCl) 震盪 15 分鐘兩次，最後用 20X SSC 溶液平衡 10 分鐘，便可進行轉漬。

轉漬時以帶正電的轉漬膜 (Millipore IMMOBILON-NY+) 壓在電泳膠片上，再依次以 3M 濾紙、衛生紙及重物壓在轉漬膜上以吸取 20X SSC 緩衝液，其間不定時更換衛生紙，經 24-36 小時後取出轉漬膜，轉漬膜表面用 2X SSC 緩衝液沖去多餘鹽類，自然乾燥後再經 crosslink 120 mJ/cm<sup>2</sup> 後便可進行南方雜合試驗。

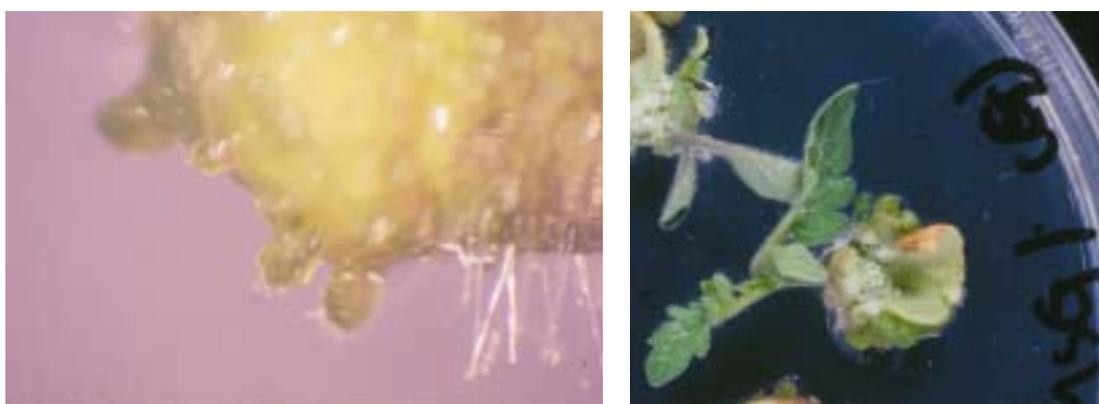
雜合前先製作放射線探針，利用 Random primer kit (Amersham Co. USA) 使經定序確認之 DNA 探針與放射線 dCTP<sup>32</sup> 相結合。將轉漬膜與預雜合緩衝液在 42 °C 反應 4 小時，再使轉漬膜、雜合緩衝液與放射線探針在 42 °C 中雜合隔夜，第二天取出轉漬膜於室溫下，以 2X SSC 緩衝液+0.1%SDS 溶液 60rpm

震盪清洗 10 分鐘兩次，再置於 50 ℃ 下 0.1X SSC 緩衝液+0.1%SDS 溶液震盪清洗 15 分鐘一次，轉漬膜乾燥後，再用底片與轉漬膜進行感光壓片，置於-70 ℃ 二到四天後將底片沖洗顯像。本項工作在國立台灣大學植物科學研究所放射線實驗室中進行。

## 結 果

### 一、培養基成分對培植體再生芽體之影響

番茄下胚軸及子葉置於 MSB5 培養基含各種 NAA 及 Kinetin 組合之再生培養基上，2 週後有兩端膨大現象，並有少許硬塊狀癒傷組織出現，3 到 4 週後有些生長調節劑組合中有肉眼可見的芽體或不定根形成，以解剖顯微鏡觀察，在培養 7 天至 10 天的膨大組織表面有一些微小的芽原體形成（圖一(a)），14 天至 18 天後有些芽原體繼續生長伸長，3 週後即有肉眼可見的芽體生成（圖一(b)）。



(a)

(b)

圖一、番茄子葉置於再生培養基後產生芽原體與枝條之情形。(a) 於切口產生癒傷組織及芽原體。(b) 芽原體繼續生長成枝條。

Fig. 1. Shoots regenerated from tomato cotyledon explants on the regeneration medium.

植物生長調節劑組合試驗結果顯示 BA5、S1-1、S1-2 及 MSG1 培養基再生芽體較多，以上述 4 種培養基添加 Timentin 150mg/L 之培植體再生率與不添加者類似(資料未發表)。番茄培植體在添加 Timentin 之 BA5、S1-1、MSG1 及 S1-2 培養基中(簡稱 BA5T、S1-1T、MSG1T、S1-2T)，初期以子葉培植體再生芽體數較下胚軸多，例如子葉培植體在第 4 週再生芽數分別為 5.7、4.2、4.0 及 4.2 個，而下胚軸培植體則為 4.0、3.2、4.3 及 3.0 個，以子葉培植體再生芽體數較多，但差異不顯著。在第 6 週後的子葉培植體再生芽數為 8.3、4.0、8.0 及 6.0 個，而下胚軸培植體則為 9.7、4.8、8.1 及 3.4 個，整體而言，初期以子葉培植體再生芽體數較多，到 5、6 週後，下胚軸培植體再生芽體數增加至與子葉培植體相近(表一)。

無論是子葉培植體或是下胚軸培植體都是以只含一種 cytokinin (BA5T 及 MSG1T) 培養基的再生芽數優於同時含 cytokinin 及 auxin 兩種之 S1-1T 及 S1-2T 培養基，例如在再生培養 6 週後，子葉於 BA5T 及 MSG1T 培養基再生芽數為 8.3 及 8.0 個，S1-1T 及 S1-2 處理者則為 4.0 及 6.0 個，若以下胚軸當培植

體，BA5T 及 MSG1T 培養基處理之再生芽數（9.7 及 8.1）顯著高於 S1-1T 及 S1-2 培養基處理者（4.8 及 3.4）（表一）。

表一、培養基組成份對番茄子葉及下胚軸片段培養之影響。

Table 1. Effect of cultural medium on hypocotyl and cotyledon culture of tomato.

Explant	Medium <sup>z</sup>	4 weeks		5 weeks		6 weeks	
		Regenerate <sup>y</sup> (%)	Numbers of Shoots	Regenerate (%)	Numbers of Shoots	Regenerate (%)	Numbers of Shoots
Cotyledon	BA5T	66.7a <sup>x</sup>	5.7a	83.3a	7.5a	83.3a	8.3a
	S1-1T	55.6a	4.2a	55.6a	3.0b	55.6a	4.0b
	MSG1T	85.7a	4.0a	100.0a	6.5ab	100.0a	8.0a
	S1-2T	61.1a	4.2a	66.7a	5.4ab	66.7a	6.0ab
Hypocotyl	BA5T	66.7a	4.0a	83.3a	7.4a	87.5a	9.7a
	S1-1T	58.3a	3.2a	66.7a	4.4bc	70.8a	4.8bc
	MSG1T	87.5a	4.3a	91.7a	6.2ab	91.7a	8.1ab
	S1-2T	70.0a	3.0a	75.0a	3.0c	75.0a	3.4c

<sup>z</sup>:BA5T: MS salt + B5 Vit.+ BA 5 mg/mL + Timentin 150mg/L

S1-1T: MS salt + B5 Vit.+ kinetin 2mg/L+ NAA 0.02mg/L + Timentin 150mg/L

MSG1T: MS salt + B5 Vit.+ zeatin 1mg/mL + Timentin 150mg/L

S1-2T: MS salt + B5 Vit.+ kinetin 2mg/L+ NAA 0.05mg/L + Timentin 150mg/L

<sup>y</sup>:Regenerate : regeneration rate of explants.

<sup>x</sup>:Means within a column followed by the same letters are not significantly different by Duncan's multiple range test at P=0.05.

## 二、農桿菌感染處理對番茄培植體再生率之影響

番茄培植體切好後，浸漬於 O.D.<sub>600</sub>=0.6-0.8 及 O.D.<sub>600</sub>=0.8-1.2 菌液濃度，以 O.D.<sub>600</sub>=0.6-0.8 菌液濃度之菌液感染番茄培植體之處理篩選後再生率為 33.1%，高於 O.D.<sub>600</sub>=0.8-1.2 處理者（22.8%），但差異不顯著。培植體與菌液浸泡感染的時間亦以感染 30 分鐘處理者篩選後再生率（33.1%）較感染 10 分鐘（28.9%）或感染 60 分鐘（31.7%）者為高。AS 濃度以 200-400 $\mu$ M 處理者有較高的再生率（27.3% 及 33.1%），不添加 AS 處理之培植體則在再生篩選培養基上不會分化再生芽體，且最後會褐化死亡。共培養 2-3 天處理篩選後再生率（33.1%-34.2%）高於共培養 1 天（23.4%）處理者（表二），但共培養 3 天處理者在抗生素篩選時容易有殘留的農桿菌長出，造成組織培養上的不便，即使以 Timentin 清洗殺菌後亦會有殘留的農桿菌長出。因此轉殖程序初步訂定如下：以番茄 8-10 天苗齡下胚軸及子葉切段浸泡在感染培養基 30 分鐘，再移至共同培養基黑暗下共培養 2 天，感染培養基及共同培養基以再生芽體數最佳之 S1-1、MSG1 及 B5 三種處理添加 AS 400 $\mu$ M 為主，共培養後再進行再生及篩選程序。

表二、菌液濃度、感染時間、acetosyringone 濃度及共培養天數對花蓮亞蔬五號番茄以農桿菌感染篩選後再生率之影響

Table 2. Effect of bacterial concentration, infection time, acetosyringone concentration and co-culture days on the gene transformation efficiency of tomato cultivar 'Hualien AVRDC 5'<sup>2</sup>.

Bacterial conc.(O.D.)	Infection time (min)	Acetosyringone conc. (μM)	Co-culture period(days)	Regenerated explants(%)
0.6-0.8	30	400	2	33.1±9.7
0.8-1.2	30	400	2	22.8±8.6
0.6-0.8	10	400	2	28.9±7.5
0.6-0.8	60	400	2	31.7±7.4
0.6-0.8	30	400	1	23.4±6.7
0.6-0.8	30	400	3	34.2±8.6
0.6-0.8	30	0	2	0
0.6-0.8	30	100	2	09.8±7.2
0.6-0.8	30	200	2	27.3±8.4

<sup>2</sup>: The co-culture medium is MSG1( MS salt + B5 Vit.+ zeatin 1mg/mL + Timentin 150mg/L) with agar 8.5g/L, and the infection medium is MSG1 medium without agar.

### 三、篩選方法對轉殖效率的影響

番茄下胚軸經共培養處理後，若先不以抗生素篩選，2 或 4 週後再以 kanamycin 50mg/L 篩選，其再生率為 33.1%-67.2%，且可獲得較多通過抗生素篩選的再生植株（22-124 株），雖然經過 PCR 檢測為陽性反應，但經 X-Gluc 染色分析均為嵌合體（表三），也就是並非全株染色後都呈藍色，有的部位在以酒精去除葉綠素後呈現白色。先以 kanamycin 20 mg/L 再以 kanamycin 50 mg/L 篩選的方法雖然通過抗生素篩選的株數較少（21-48 株），但全株以 X-Gluc 染色都呈藍色，表示並非嵌合體，而表現 CaMv 35S 啟動子驅動的全株具有 GUS 基因表達現象。若培養體開始就以 hygromycin 50 mg/L 篩選，則在篩選後 2-4 週便陸續褐化死亡，沒有芽體再生（表三）。

以含 10g/L glucose 之感染及共同培養基處理，以表三方法 4 進行篩選，在 48 株初步通過抗生素篩選的植株中有 7 株具有 GUS 基因全株表達現象，轉殖效率較其他培養基為高。

表三、篩選方法及共培養基對番茄亞蔬五號基因轉殖之影響。

Table 3. Effect of selection method and co-culture medium on the gene transformation efficiency of tomato cultivar 'Hualien AVRDC 5'<sup>z</sup>.

Selection methods <sup>y</sup>	Co-culture medium <sup>x</sup>	Regenerated explants(%)	Shoots /explant	GUS gene expression	Description
1	MSG1AS	52.9±8.9	2.8±0.9	1/38	chimera
1	BA5AS	34.3±7.9	2.2±1.1	1/23	chimera
1	S1-1AS	33.1±9.7	2.1±0.8	1/22	chimera
2	MSG1AS	67.2±11.1	3.1±0.9	3/135	chimera
2	BA5AS	42.3±9.7	2.7±1.2	2/124	chimera
2	S1-1AS	36.8±10.4	2.9±1.1	4/98	chimera
3	MSG1AS	69.4±11.1	3.3±1.0	0	
3	S1-1AS	44.2±10.1	2.5±1.1	0	
3	MSG1AS	74.3±21.8	3.4±1.1	0	
4	MSG1AS	58.1±21.1	1.8±0.6	1/26	Normal transformants
4	BA5AS	49.4±17.6	1.5±0.5	3/24	Normal transformants
4	S1-1AS	52.1±19.3	1.5±0.8	1/21	Normal transformants
4	MSG1ASG	61.2±18.2	2.1±0.7	7/48	Normal transformants

<sup>x</sup> MSG1AS : MS salts,B5Vit.,zeatin 1mg/l,sucrose 30g/l,Agar 8.5g/l,AS400μM

S1-1AS : MS salts,B5Vit.,kinetin 2mg/L, NAA 0.02mg/L, sucrose 30g/L, Agar 8.5g/L, AS 400μM

B5AS : MS salts,B5Vit.,kinetin 2mg/L,NAA 0.02mg/L, sucrose 30g/L, Agar 8.5g/L, AS 400μM

MSG1ASG : MS salts,B5Vit.,zeatin 1mg/L, sucrose 30g/L, Agar 8.5g/L, AS 400μM, Glucose 10g/L

<sup>y</sup> Method 1 : coculture→regeneration medium with Timentin 200mg/L and without kanamycin for 2 weeks→regeneration medium with kanamycin 50mg/L and Timentin 200mg/L

Method 2 : coculture→regeneration medium with Timentin 200mg/L and without kanamycin for 4 weeks→regeneration medium with kanamycin 50mg/L and Timentin 200mg/L

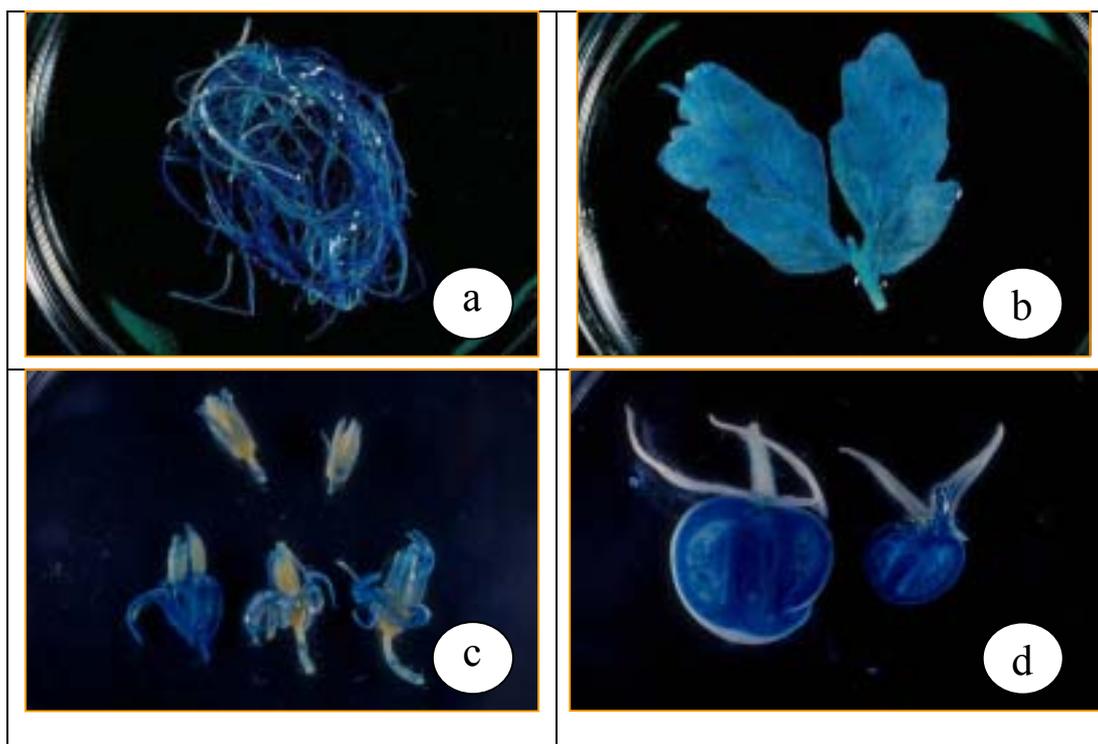
Method 3 : coculture→regeneration medium with kanamycin 50mg/L and Timentin 200mg/L

Method 4 : coculture→regeneration medium kanamycin 20mg/L and Timentin 200mg/L→regeneration medium with kanamycin 50mg/L and Timentin 200mg/L

<sup>z</sup> The infection medium is the same as the coculture medium but without agar.

#### 四、GUS 基因化學呈色檢定、PCR 檢定及南方雜交檢定

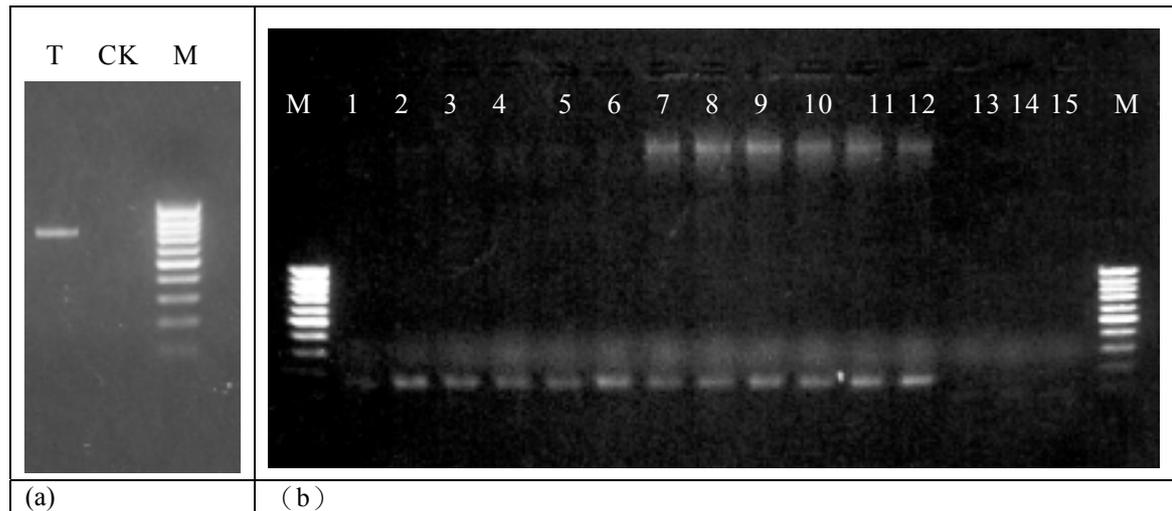
將莖、葉為 GUS 基因染色全為藍色之擬轉殖植株，移至隔離溫室種植，將其根、莖、葉、花、果實及種子取下進行 X-Gluc 基因染色如圖二，證實全株表現 GUS 基因的植株，可以經由以上轉殖技術獲得，並可以在隔離溫室正常生長及結實。



圖二、番茄‘花蓮亞蔬五號’基因轉殖植株根(a)、葉(b)、各時期的花(c)及兩生長時期的果實(d)經 X-Gluc 染色呈現藍色現象。

Fig. 2. Histochemical GUS assay in roots(a), leaves(b), flowers(c) and fruits(d) of tomato cultivar ‘Hualien AVRDC 5’ transformants.

轉殖番茄 DNA 以 GUS723 引子進行 PCR 反應，經電泳後，在 723bp 處有一明顯條帶，而未轉殖之對照則無此條帶（圖三），此條帶經過回收定序之後，比對 NCBI 資料庫確定為 GUS 基因片段無誤，顯示以 PCR 分析證明此擬轉殖株確有基因被轉殖進入。經過各部位 DNA 之 PCR 檢測顯示轉殖植株的根、花、果及葉片的基因組中亦證實有 GUS 基因被轉殖進入（圖三）。



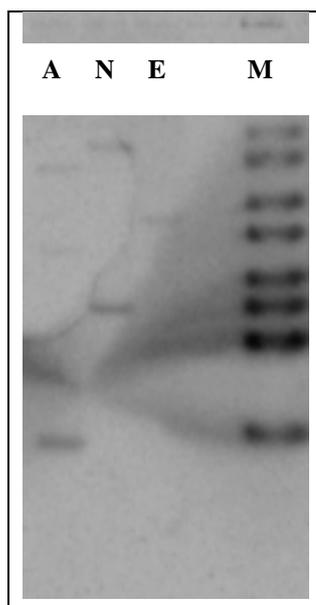
圖三、轉殖基因番茄植株運用 PCR 檢測之產物電泳圖

(a)以引子 GUS723 進行 PCR 增幅產物，欄位 T：轉殖番茄 DNA，欄位 CK：沒有基因轉殖之對照植株，欄位 M：100bp Marker

(b)以引子 GUS179 進行 PCR 增幅產物，欄位 1-3：根 DNA，4-6：花 DNA，7-9：果 DNA，10-12：葉 DNA，13-15：沒有基因轉殖之對照植株葉片 DNA，欄位 M：100bp Marker

Fig. 3. The PCR products amplified from tomato cultivar 'Hualien AVRDC 5' gene transformants by primer GUS723(a) and GUS172(b).

經過三種限制酵素酶切電泳後經南方雜合檢測結果顯示，在 *Ava*I 酶切的 lane1 有 3 個條帶，而 *Nco*I 及 *Eco*RI 酶切者有兩個條帶（圖四），表示轉殖植株的基因組中有至少兩個 GUS 基因片段被轉殖進入。



圖四、基因轉殖番茄植株 DNA 以三種限制酶 *AvaI*, *NcoI*, *EcoRI* 酶切後以帶有 GUS 基因片段之放射線探針進行南方式雜交法之條帶圖。

欄位 M 為 1Kp 之 Marker，條帶由上而下依次為 10, 9, 7, 6, 5, 4, 3, 1Kp。

Fig. 4. Southern blot of tomato cultivar 'Hualien AVRDC 5' gene transformants.

## 討 論

McCormik 等人 (1986) 及 Barg 等人 (1997) 指出番茄基因轉殖時篩選再生培養基要添加高濃度 BA (2.5mg/L) 及低濃度 IAA (1.0 mg/L) 較為合適；而許多報告以添加 zeatin 0.5-2 mg/L 及 IAA 0.01-0.5mg/L 作為再生篩選培養基之植物生長調節劑成分 (Hamza and Chupean, 1993; Van Roekel et al., 1993; Park et al., 2003; Carolina and Francisco, 2004; Sigareva et al., 2004; Velcheva et al., 2005)，Fillatti 等人 (1987)、Ling 等人 (1991) 及 Romero 等人 (2001) 則在番茄基因轉殖之篩選再生培養基只添加高濃度 zeatin (2 mg/L) 即可獲得轉植株。本研究結果顯示以 MSG1、S1-1、B5 三種培養基可使番茄下胚軸和子葉分化較多芽體，其中又以 MSG1 及 BA5 最適合，這三種培養基都是含高濃度的細胞分裂素如 zeatin 1mg/L、BA 5mg/L 或 kinetin 2 mg/L，只有 S1-1 培養基另含 NAA 0.02mg/L (表一)，一般而言，植物組織培養要再生芽體都需要添加高濃度細胞分裂素 (cytokinin) 配合低濃度細胞生長素 (auxin)，然而番茄下胚軸及子葉在只含 zeatin 1mg/L 或 BA 5mg/L 的培養基中即可獲得較多的芽體數，加上基因轉殖試驗中，芽體再生數也以 MSG1 共培養和再生篩選培養基處理較多 (表二)，推測花蓮亞蔬五號番茄之子葉和下胚軸培植體天然 auxin 含量較多，不需要額外外加 NAA 等 auxin 類之生長調節劑，結果與 Fillatti 等人 (1987)、Ling 等人 (1991) 及 Romero 等人 (2001) 的報告類似。

番茄利用農桿菌轉殖基因時之培植體大都使用葉圓片、節間、下胚軸或子葉，其中又以子葉的報告最多 (Fillatti et al., 1987; Hamza and Chupeau, 1993; Van Roekel et al., 1993; Barg et al., 1997; Ling et al., 1998; Frary and Hamilton, 2001; Chyi and Phillips, 2001; Ellul et al., 2003; Carolina and Francisco, 2004)。

Fray 及 Earle (1993) 以下胚軸及子葉當作材料，認為下胚軸在基因轉殖後 110 天的再生芽數超過子葉培植體，而本試驗顯示在 5 週後下胚軸就有分化較多芽體的現象（表一），但若考量初期抗生素篩選會使培植體生長停滯或死亡的現象，篩選再生芽體時應選擇初期再生能力強的培植體，這也許是許多報告選擇子葉當作培植體的因素。

Nauerby 等人 (1997) 及 Chang 等人 (1998) 認為菸草培植體與農桿菌共同培養後時以 Timentin 殺農桿菌的效果比常用的 cefotaxime 或 carbenicillin 為佳，而且所再生的芽體數也較多，以番茄進行基因轉殖時使用 Timentin 也有相同之效果 (Ling et al., 1998)，Costa 等人 (2000) 進行 4 個番茄品種子葉組織培養，顯示於培養基添加 Timentin 300mg/L 可使其中 3 個品種增加再生芽體數，本試驗顯示番茄子葉切段組織培養時添加 Timentin 150mg/L 對再生芽體數並沒有顯著促進的效果，可能是 Timentin 對花蓮亞蔬五號番茄的增加再生芽體效果不佳所致。

Fillati 等人 (1987) 指出番茄基因轉殖時之農桿菌濃度會影響轉殖效率，最適合濃度為每 mL 有  $5 \times 10^8$  個農桿菌為佳 (O.D.<sub>600</sub> 約為 0.8)，Fary 及 Earle (1996) 結果顯示 O.D.<sub>600</sub> 等於 0.4 時可使轉殖效率達到 10.6%，Ellul 等人 (2003) 也將共培養菌液濃度減少到每 mL 有  $10^2$ - $10^3$  個農桿菌 (O.D.<sub>600</sub> = 0.1-0.15)，使番茄品種 p73 的轉殖效率從 2.5% 提高到 11.2%。本試驗結果顯示高菌液濃度 (O.D.<sub>600</sub> = 0.8-1.0) 轉殖效率較差，將菌液濃度減少到 O.D.<sub>600</sub> = 0.6-0.8 時可提高轉殖效率。

在感染時間對轉殖效率的影響方面，並沒有報告針對探討此因子，Fillati 等人 (1987)、Hamza 及 Chupeau (1993)、Ling 等人 (1998) 的步驟為 30 分鐘，而 McCormik 等人 (1986)、Barg 等人 (1997) 的試驗中只將培植體切口與感染菌液浸濕即可進行共培養，本試驗結果則顯示以 30 分鐘為佳（表二）。

許多報告的試驗步驟都在共培養時加入馬鈴薯、矮牽牛及番茄的供養細胞 (Fillati et al., 1987; Hamza and Chupeau, 1993; Von Roedel et al., 1993; Fary and Earle, 1996; Ling et al., 1998)，而 Davis 等人 (1991) 認為添加 acetosyringone 處理之轉殖效率高於受傷處理，Fillati 等人 (1987) 報告顯示添加 acetosyringone (AS) 效果與加供養細胞處理差異並不顯著，Lipp João 及 Brown (1993) 則認為添加 AS 可增加轉殖效率，本試驗結果顯示添加 AS 的確影響轉殖成功率，添加供養細胞時，培養及繼代維持作業繁瑣，因此共培養時以添加 AS 較易作業。

表三之 3 種篩選方法中，以先移至不含抗生素之再生培養基 2 週後或 4 週後再移至含高濃度抗生素之再生篩選培養基的方法（表三，方法 1、2）及先移至含低濃度抗生素培養基兩週後再移至含高濃度抗生素之再生篩選培養基（表三，方法 4）可以產生轉殖植株，而共培養後後立即移至高濃度抗生素之再生篩選培養基則無 GUS 基因表現之植株（表三，方法 3），顯示除了上述因子之外，轉殖後之篩選方式亦是一個重要因子，但目前並沒有試驗報告討論此項因子，推測可能是番茄培植體切口轉殖成功之細胞數較少，若一開始就以高濃度抗生素篩選，使附近細胞迅速死亡，而轉殖細胞接觸培養基機會低，營養供給均仰賴鄰近細胞之幫助，若鄰近細胞死亡，則此轉殖細胞靠自營方式生存之機率極低，加上鄰近細胞迅速死亡可能會放出一些不利生長之酚類化合物等物質，亦不利於此轉殖細胞之生長。而轉殖細胞與沒轉殖基因細胞的生長分化是一種彼此競爭的狀態，這可以解釋若開始不加抗生素，則轉殖細胞與沒轉殖細胞彼此生長互相嵌合而易分化成嵌合體植株。因此在轉殖程序後，開始予以低濃度抗生素處理，使沒轉殖基因的細胞生長緩慢但不至於死亡，卻可以使轉殖細胞正常分化的機率增加，可在後續形成再生植株時減少形成嵌合體之機率。以液體培養基進行基因轉殖可增加番茄基因轉殖效率到達 36.4% (Verlicheva et al., 2005)，可能就是因為基因轉殖的細胞可充分接觸到培養基，而不會有上述因為接觸不到培養基死亡的情形，但液體培養基轉殖必須每天更換培養基到芽體再生為止，步驟繁瑣，除非轉殖效率非常低，為節省勞力和降低污染機率，不建議採用液體培養的方式。

在番茄以農桿菌轉殖基因研究中僅有少數在感染及共同培養基中以 glucose 取代 sucrose (Shahin et al., 1986; Hamza and Chupeau, 1993; Sigareva et al., 2004; Velcheva et al., 2005)，但沒有說明原因及討論，推測可能是跟農桿菌比較容易在含 glucose 溶液中生長及感染，額外添加 glucose 也可使 MSG1ASG (表三) 滲透壓增加，而使轉殖效率提高。

根據南方雜合檢定，以 *NcoI* 及 *EcoRI* 酶切者出現兩個條帶，推測此轉殖植株轉進兩個基因序列 (copy)，而以 *AvaI* 酶切者有三個條帶的原因 (圖四)，可能是有大的 DNA 片段並沒有被 *AvaI* 酶切乾淨，造成未被切開之長片段被放射線探針雜合而顯像所致。

本轉殖試驗產生之轉殖基因番茄根、莖、葉、花、果實以 X-Gluc 化學染色法及 PCR 檢定，確認為全株可表達 GUS 基因之轉殖株，沒有嵌合體轉殖株，顯示此轉殖技術可應用在番茄基因轉殖。

根據以上結果所示，花蓮亞蔬五號番茄以農桿菌進行基因轉殖的技術已經建立成功，目前正以此技術進行番茄的 Bt 基因轉殖，相信此技術可提供未來更多的功能性基因轉殖於番茄上表達，以改進現有番茄的性狀。

## 致 謝

本試驗研究經費承蒙花蓮區農業改良場技術人員楊淑芬、楊蕙慈及蔡嘉欣小姐協助轉殖植株繼代培養及抽取 DNA、PCR 檢定等工作，南方雜合試驗資料有賴於台灣大學植物科學研究所慷慨借用放射線實驗室及相關放射線耗材，使試驗得以完成。文成後承蒙台灣大學植物科學研究所葉開溫教授斧正。謹此致謝。

## 參考文獻

- 1.曾喜一 199 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。
- 2.Barg, R., M. Pilowsky, S. Shabtai, N. Carmi, A. D. Szechman, B. Dedicova, and Y. Salts. 1997. The TYLCV-tolerant tomato line MP-1 is characterized by superior transformation competence. *J. Exp. Bot.* 48: 1919-1923.
- 3.Carolina, C. and A. C. M. Francisco. 2004. Tomato transformation and transgenic plant production. *Plant Cell Tissue and Org. Cul.* 76: 269-275.
- 4.Chang, Z. M., J. A. Schnurr, and J. A. Kapaun. 1998. Timentin as an alternative antibiotic for suppression of *Agrobacterium tumefaciens* in genetic transformation. *Plant Cell Rep.* 17: 646-649.
- 5.Chyi, Y. S. and G. C. Phillips. 1987. High efficiency *Agrobacterium*- mediated transformation of *Lycopersicon* based on conditions favorable for regeneration. *Plant Cell Rep.* 6: 105-108.
- 6.Costa, M. G. C., F. T. S. Nogueira, M. L. Figueira, W. C. Otoni, S. H. Brommonschenkel, and P. R. Cecon. 2000. Influence of the antibiotic Timentin on plant regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultivars. *Plant Cell Rep.* 19: 327-332.
- 7.Davis, M. E., A. R. Miller, and R. D. Lineberger. 1991. Temporal competence for transformation of *Lycopersicon esculentum* cotyledons by *Agrobacterium tumefaciens*: relation to wounding-healing and soluble plant factor. *J. Expt. Bot.* 42: 359-364.
- 8.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. *Theo. App. Genet.* 106: 231-238.
- 9.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. *BioTec* 5: 726-730.
- 10.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.
- 11.Frary, A. and C. M. Hamilton. 2001. Efficiency and stability of high molecular weight DNA transformation: an analysis in tomato. *Transgenic Res.* 10: 121-132.
- 12.Hamza, S. and Y. Chupeau. 1993. Re evaluation of conditions for plant regeneration and *Agrobacterium* -mediated transformation form tomato (*Lycopersicon esculentum*). *J. Expt. Bot.* 44: 1837-1845.
- 13.Jefferson, R. A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the *GUS* gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5: 387-405.
- 14.Ling, H. Q., D. Kriseleit, and M. W. Ganal. 1998. Effect of ticarcillin/potassium on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium* -mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Cell Rep.* 17: 843-847.
- 15.Lipp João, K. H. and T. A. Brown. 1994. Long-term stability of root cultures of tomato transformed with *Agrobacterium rhizogenes* R1601. *J. Exp. Bot.* 45: 641-647.
- 16.McCormick, S., J. Niedermeyer, J. Fry, A. Barnason, R. Horsch, and R. Fraley. 1986. Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* 5: 81-84.

17. Nauerby, B., K. Billing, and R. Wyndaele. 1997. Influence of the antibiotic Timentin on plant regeneration compared to carbenicillin and cefotaxime in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Sci.* 123: 169-177.
18. Park, S. H., J. L. Morris, J. E. Park, K. D. Hirchi, and R. H. Smoth. 2003. Efficient and genotype independent *Agrobacterium* mediated tomato transformation. *J. Plant Physio.* 160: 1253-1257.
19. Romero, J. P., G. Houlne, L. Cana, R. Schantz, and J. Chamarro. 2001. Enhanced regeneration of tomato and pepper seedling explant for *Agrobacterium* -mediated transformation. *Plant Cell Tissue and Org. Cul.* 67:173-180.
20. Shahin, E. A., K. Sukhapinda, R. B. Simpson, and R. Spivey. 1986. Transformation of cultivated tomato by a binary vector in *Agrobacterium rhizogenes*: transgenic plants with normal phenotypes harbor binary vector T-DNA, but no Ri-plasmid T-DNA. *Theor. App. Genet.* 72: 770-777.
21. Sigareva, M., R. Spivey, M. G. Willits, C. M. Kramer, and Y. F. Chang. 2004. An efficient mannose selection protocol for tomato that has no adverse effect on the ploidy level of transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 23: 236-245.
22. Van Roekel, J. S. C., B. Damm, L. S. Melchers, and A. Hoekema. 1993. Factors influencing transformation frequency of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Cell Rep.* 12: 644-647.
23. Velcheva, M., Z. Faltin, M. Flaishman, Y. Eshdat, and A. Perl. 2005. A liquid culture system for *Agrobacterium* -mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Sci.* 168: 121-130.