

球根花卉基因改造與未來之挑戰

主講：Dr. H. Löffler

荷蘭國家農業研究院作物育種及繁殖研究中心

翻譯及作圖：林學詩

行政院農業委員會花蓮區農業改良場

譯作者按：

本文乃種苗改良繁殖場於88年1月14至15日於台中國立自然科學博物館舉辦之「國際球根花卉產業研討會」，由荷蘭國家農業研究院作物育種及繁殖研究中心球根花卉專家H. Löffler博士所作之精采演講內容，經徵得沈場長再發博士之慨允調借現場錄影帶，加以節錄、編譯而成。

譯者在現場口譯時發現Dr. Löffler演講之內容，與會前提供給種苗場之論文草稿內容，有很大之不同，尤其在百合基因轉殖研究之部份，他提供了許多寶貴的研究心得與技術資訊，甚至有些部份是可以列入研究機密範圍，一般荷蘭的研究人員是不會輕易示人的，實頗令譯者相當驚訝與動容。

鑒於國內正大力推動花卉生物技術發展之際，亟需蒐集各方之資訊，爰譯作此文並作圖解說以饗同好。

前言

基因改造科技為增加作物遺傳變異之一創新科技，而非用來取代傳統育種技術，其最終還是需要與傳統育種相結合，以加速作物育種效率。近年來遺傳工程技術之發展在作物品種改良上有很大之貢

獻，尤其在大宗穀物如大麥、小麥、水稻、大豆等作物，成效更為顯著。球根花卉方面雖然起步較晚，但近年來也有相當多的突破，例如在百合、鬱金香、唐菖蒲、百合水仙等作物，均已具有基因轉殖成功案例之報告。由於時間所限，無法一一介紹，因此本文側重於介紹近十年來，在荷蘭國家農業研究院「作物育種及繁殖研究中心」所持續進行之「百合基因轉殖」研究成果，並敘述未來發展之方向與挑戰。

基因轉殖原理簡介

常見的植物基因轉殖方法有：農桿菌法(*Agrobacterium*)、粒子轟炸法(*particle bombardment*)、電穿孔法(*electroporation*)、顯微注射法(*microinjection*)……等等，而其中被公認為最有效者為農桿菌法，和粒子轟炸法。

由於種種原因，農桿菌在雙子葉植物基因轉殖效果很好，卻在單子葉植物方面表現不佳，反而以粒子轟炸法成效較好。球根花卉多屬於單子葉植物，本研究中心過去所做的結果亦顯示，以粒子轟炸法效果較佳，因此底下所介紹的是以本項技術為主。唯近年來國際間發展出一些致毒能

力更強之農桿菌品系，能有效的感染單子葉植物，使得農桿菌法在球根花卉基因轉殖上露出一線曙光。

粒子轟炸法的原理簡單的說，是將攜帶含特殊基因之去氧核糖核酸(DNA)，吸附在「金」或「鎢」粒子上，然後在一個密閉真空的機器（即俗稱的基因槍）裡，利用氮氣急速推動，打入植物材料（例如葉片、莖節、鱗片、莖頂、癒傷組織等等）的細胞核中，使這外來的DNA中特帶有特殊基因之片段，嵌入植物體本身染色體的DNA裡，成為植物染色體之一部份，這個步驟稱之為「轉殖(transformation)」。之後這些經過基因轉殖的細胞，逐漸發育成為植株，於是外來的基因便會在這些植物體上表達出來，進而達到基因改造之目的。

粒子轟炸法的優點很多，它的轉殖對象沒有物種之限制，單子葉植物、雙子葉植物均可行，且一次可以轉殖很多個基因，這是農桿菌所無法做到的。這種方法稱為共炸法(co-bombardment)。其方法是將二種以上不同的DNA片段（攜帶不同基因）混合一起，再吸附於金粒子上，於是一次轟炸同時可以達到多基因轉殖之目的。最近有一篇研究報告證明，在水稻方面，有人將15種基因的DNA一次同時打入，結果得到轉殖成功的水稻植株，同時帶有14個轉殖基因。

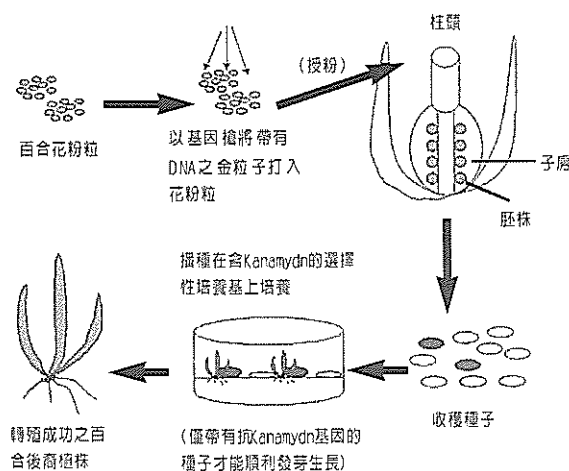
欲進行轉殖之基因（DNA片段）必須先行構築，底下簡介DNA構築之原理：DNA一般是構築在特殊的載體上（例如Ti質體），利用酵素將DNA片段粘接到質體中，而質體本身也是DNA，一旦進入植物

細胞之後，它會協助將構築好的特殊DNA片段，嵌合到植物染色體中特定的DNA位置上。常見的DNA構築帶有一段報導基因（例如在特殊染液裡，可以使植物細胞呈現藍色的GUS基因），如此研究人員可以很容易的察覺轉殖是否成功。此外，為了便於篩選轉殖細胞，通常還會連接一段帶有抗殺草劑基因（如抗Basta的PAT基因），或抗抗生素基因（如抗kanamycin的NPTII基因）。

百合基因轉殖技術介紹

本研究中心所從事的百合基因轉殖技術研發工作，可以歸納為五大項：(1)花粉轉殖法，(2)胚性癒傷組織轉殖法，(3)鱗片切片轉殖法，(4)全鱗片轉殖法，(5)農桿菌轉殖法。其中第1到4第項都是採用粒子轟炸法，只有第5項是採行農桿菌法；第1,2,3項已經宣告成功，第4,5項目前正在進行中，尚未有結果。

▼圖一.百合花粉基因轉殖法流程



轉殖成功的百合種類僅限於鐵炮百合，其他亞洲型、東方型百合則尚未成功。在我們研究的基因構築裡，有一個名為pPG5者，轉殖成效最佳，這個構築中帶有一個GUS報導基因，和一個抗殺草劑的選拔性基因”PAT”；另一個特點是每個基因都是使用雙套CaMV 35S啟動子(promoter)來啟動。據了解，CaMV 35S啟動子在雙子葉植物基因轉殖時表現非常良好，在單子葉植物方面則表現不佳，但我們的研究結果卻顯示，其在單子葉的百合上亦有良好之表現。以下逐項介紹各項研究成果：

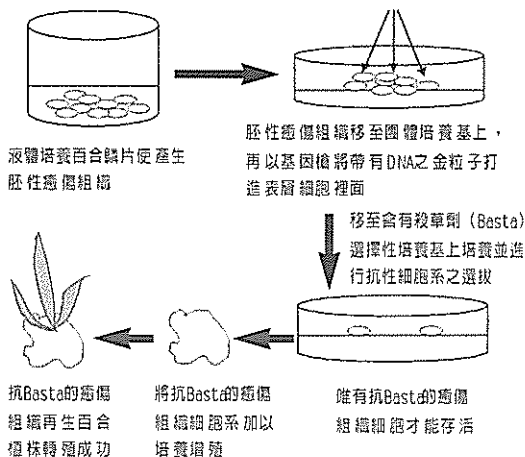
(1) 花粉轉殖法

本項技術於十年前開始研發，並在七年前宣告成功，試驗是利用粒子轟炸法來進行，以抗生素kanamycin為選拔用藥劑。轉殖流程如圖一所示：先取百合的花粉粒，用基因槍將吸附著DNA之金粒子打

入花粉裡，接著將花粉授到雌花的柱頭上，以完成受精程序。等果實成熟後採收種子，把種子播種到含有抗生素kanamycin之培養基上培養，結果僅帶有抗kanamycin基因之種子才能存活、順利發芽、長成植株，經再確認證明是轉殖成功植株。

本項技術的轉殖成效很好，轉殖後之目的基因也在下一代植株表現出來，操作上並不是很困難，但其缺點是太費時又費工，因為百合從授粉到獲得植株需時甚久，同時還要經過多個培養階段。此外，因其利用花粉為轉殖起始物，被轉殖之基因要到下一代才會表達出來，中間必須經過有性生殖的受精過程才能產生下一代植株，所以遺傳性狀已經經過重組，後裔植株的園藝特性與其母株必然不同，而無法達到商業栽培品種希望「型實合一(true to type)」的要求，也就是失去基因轉殖技術所標榜之優勢，因此有必要再研發其他更合適之方法。

▼圖二.百合胚性癒傷組織基因轉殖法流程



(2) 胚性癒傷組織轉殖法

本項技術的特點是利用胚性癒傷組織為轉殖起始物，由於癒傷組織是來自於現有品種之鱗片體細胞，由此再生而來之植株，與原來母株的園藝特性是相同的，因此可以達到型實合一之要求。胚性癒傷組織之誘導，及基因轉殖流程，詳如圖二所示。

取百合的胚性癒傷組織，用基因槍將吸附著DNA（內含抗殺草劑基因）之金粒子打入，再將癒傷組織置放在含有殺草劑Basta之選擇性培養基上培養。結果僅帶有

抗Basta基因之癒傷組織細胞才能順利存活，而後產生百合植株，經確證證明是轉殖成功植株。

本項技術證明為有效，優點很多，唯其缺點是試驗需時甚久，培養癒傷組織本身就是一項費時的工作，此外從開始打基因槍到轉殖成功至少也需費時6個月，因此本中心繼續再尋求其他更省時之方法。

(3) 鱗片切片轉殖法

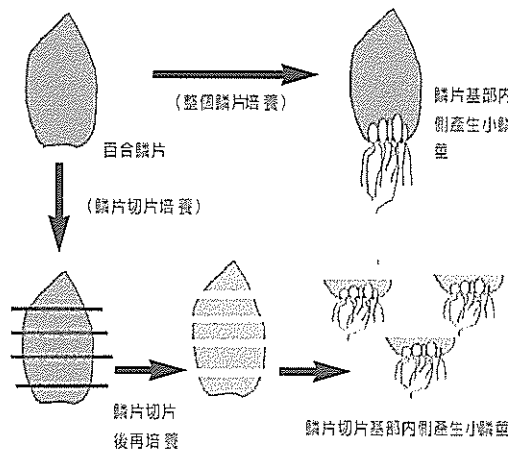
百合鱗片是一最佳的種球繁殖器官，圖三為一百合鱗片組織培養法之詳細流程，如將整個鱗片放在培養基上培養，不久就會在其內側基部產生許多小鱗莖；如果將鱗片橫切成片狀，再放到培養基上培養，則在每一小片的內側基部，也會產生許多小鱗莖（小植株）。鱗莖橫切片既然有這麼強的再生能力，也許可以作為基因轉殖的起啓材料。

圖四是利用百合鱗片切片進行基因轉

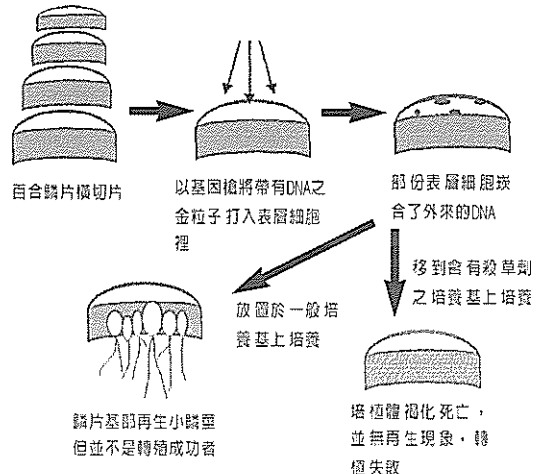
殖之詳細流程，用基因槍將吸附著DNA（內含抗殺草劑基因）之金粒子打入鱗片，經取樣測試顯示，鱗片橫切面之表層細胞確實有外來基因表現之現象。如果將此鱗片切片放在含有殺草劑之培養基上培養，則培植體全部褐化死亡，無法得到轉殖植株。如果將此鱗片切片放在一般的培養基上培養，鱗片內側基部會產生若干小鱗莖，但這些都不是轉殖植株。試驗結果顯示，雖然鱗莖切面之細胞有外來基因表達之現象，但這些細胞不是分佈在內側基部，也就無法發育產生小植株，因此這個方法仍有盲點存在，必須加以改良。

圖五是改良式百合鱗片切片基因轉殖之流程，與圖四最大的不同之處在於鱗片切成片狀後，先經過一誘導癒傷組織之程序，然後再用基因槍將吸附著DNA（內含抗殺草劑基因）之金粒子打入癒傷組織裡。之後將癒傷組織放在含有殺草劑之培養基上培養，結果僅帶有抗殺劑基因之癒

▼圖三.百合鱗片組織培養流程



▼圖四.百合鱗片切片基因轉殖法流程



傷組織細胞才能存活下來，經繼代培養後得到轉殖成功之百合植株。此法證明為有效，唯仍需要經過癒傷組織培養之過程。

(4) 全鱗片轉殖法

本項技術基本上也是圖四的改良型，乃為了縮短基因轉殖過程所花費的時間而設計，詳細流程如圖六所示，首先用基因槍將吸附著DNA（內含抗殺草劑基因）之金粒子，直接打入整個鱗片內側的細胞裡，再把鱗片橫切為數片，放置在含有殺草劑的培養基上培養。經取樣測試顯示，鱗片切片內側基部細胞確有外來基因表現之現象。由於鱗片內側基部的細胞，具有再生小鱗莖之能力，因此也就有可能獲得抗殺草劑之植株。唯本項試驗正在進行當中，目前尚未由此獲得轉殖植株。

(5) 農桿菌轉殖法

以上所介紹的數種百合基因轉殖技

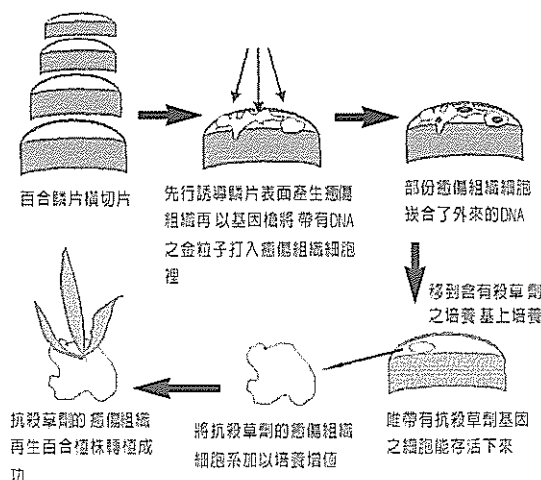
術，均以鐵炮型百合為研究對象，且均是利用基因槍的「粒子轟炸法」，本中心對於粒子轟炸法仍不十分滿意，且希望基因轉殖技術能擴及商業栽培上更重要的亞洲型、東方型百合品種，因此嚐試進行農桿菌轉殖法之研究。

近年，義大利的研究人員發現，亞洲型百合，可以用其葉片作為繁殖材料，其方法詳如圖七所示。將百合莖生葉片由其花莖上取下來，切成上下兩半，放在培養基上培養，結果葉片的下半部（稱為第一位置，參看圖七）產生許多小鱗莖，一如鱗片培養之情形，而上半部（第二位置）則無此現象。

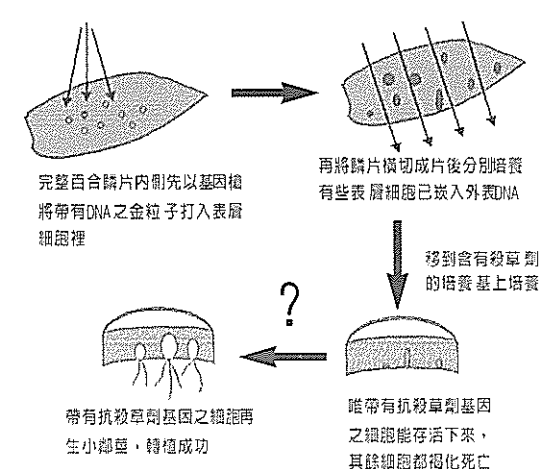
將此種葉片浸漬在含農桿菌的溶液中一段時間，之後取出放在培養基上進行共培養，使其受農桿菌感染，希望由此達成基因轉殖之目的，並在日後得到轉殖成功之植株。

目前有二種農桿菌品系在我們的研究

▼圖五.改良式百合鱗片切片基因轉殖法流程



▼圖六.百合全鱗片基因轉殖法流程



中進行測試，其內含之質體各帶有特殊的基因構築，一個是EHA105/pcambia1301，另一個是LBA4404/pTOK233，這兩個構築均帶有一GUS報導基因，和一個抗hygromycin（一種毒性很強之抗生素）基因，此外其致毒性均很強，換言之很容易感染單子葉植物。

本項轉殖試驗正在進行當中，目前的研究結果顯示，葉片與農桿菌共培養後，在葉片基部可以偵測得到有外來基因(藍色GUS基因)表現之現象，LBA4404農桿菌品系的表現比EHA105要好。此外，由於生長在葉片基部位置的細胞，具有再生小鱗莖之能力（如前所述），因此轉殖成功的機會很大，且讓我們拭目以待。

未來之目標與挑戰

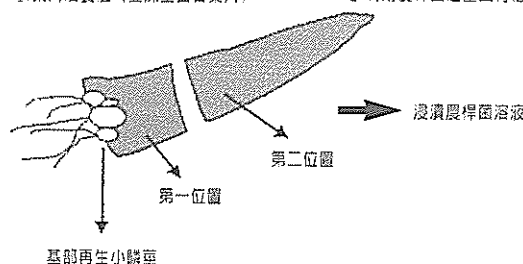
百合基因轉殖技術已經獲得突破性之進展，唯其成果僅限於鐵炮型百合，將來應該繼續在亞洲型、東方型雜交百合上努力，因為這兩類百合才是市場上的主力。此外，目前報導的成果都是以轉殖成功報導基因，或選擇性基因為主，將來必須朝轉殖有用基因方向前進。未來球根花卉有用基因改造之目標，不外乎以下各項：抗病毒病、抗害蟲、抗真菌性病害、花色、花型基因之改造等等，而這些都是傳統育種法所不易做到的，藉助生物技術中的基因轉殖技術，可能解決這些問題，所以這些是未來重要的研究方向，而尋找這些基因的研究，也是未來非常重要的工作目標。

現今世界上保護智慧財產權的觀念越

▼圖七.百合農桿菌基因轉植法

1. 葉片培養法（亞洲型百合葉片）

2. 利用農桿菌之基因轉殖



來越受重視，在生物科技領域裡，有越來越多的技術、基因、程序、材料……等等已經被研究單位、人員、或私人司申請專利保護，要引用時都需先獲得授權，這裡面存在很大的商機。其實智財權的價值還是決定在於市場需要，保護過當或不當，將造成科技停滯不前，或造成生技研發單位、公司的重大損失，兩者之間如何取得平衡，是未來業界一大挑戰。

最後，消費大眾如何看待生物技術產品，也是未來需要面對的一大課題，花卉不是食用作物，比較不會受到消費者排斥，這方面可能比較佔優勢。最終是要大家都能接受生技產品，基因轉殖科技才有其發展的前途。

