

## *Haworthia* 屬植物再生與基因轉殖系統建立

侯 亭 玟<sup>1)</sup> 陳 彥 銘<sup>2)</sup> 潘 怡 君<sup>3)</sup>

關鍵字：*Haworthia*、癒傷組織、Hygromycin、Cefotaxime、農桿菌基因轉殖、GUS

**摘要：***Haworthia* (瓦葦屬) 為多肉植物，部分品種葉片上帶有透明窗之構造，備受玩家喜愛。為了追求新穎的品種，常利用雜交進行育種，但實生苗成長時間長且雜交不易，基因轉殖是一個縮短育種時間並創造新品種的方式。本實驗目地為建立 *Haworthia* 屬多肉植物之農桿菌轉殖系統。以'三仙壽'癒傷組織作為農桿菌感染材料，先進行抗生素濃度試驗，結果顯示癒傷組織適合以 5 mgL<sup>-1</sup> hygromycin 光度 600 lux 進行篩選，cefotaxime 濃度 0 - 400 mgL<sup>-1</sup> 皆生長良好。農桿菌 LBA4404 攜帶 pCAMBIA1305.1 質體以 OD<sub>600</sub> 為 0.2 的濃度感染壽之癒傷組織 10 分鐘，共培養四天後去除農桿菌，感染後培養八週再進行 5 mgL<sup>-1</sup> hygromycin 篩選，篩選四週後可得到具有 GUS 基因表現的嵌合體轉殖株。

### 前 言

*Haworthia* 屬分為硬葉系與軟葉系，軟葉系的植物因應乾燥缺水的環境，演化出肥厚的葉或莖用來儲存水分，軟葉系植物葉頂端還具葉窗 (window) 之特殊結構 (Christensen-Dean and Moore, 1993)，部分品種之葉窗為半透明或帶有紋路、毛狀體等，使得 *Haworthia* 屬多肉植物倍受園藝愛好者喜愛。但部分軟葉系品種生長速度緩慢，其半年可能僅長出一片葉，種子進行有性繁殖，實生苗生長至成株可能需耗費 2 年以上的時間，以花梗、葉、小芽等材料進行組織培養可縮短 *Haworthia* 屬多肉植物之生長時間 (吳, 2011; Hayashi, 1987; Mycock, 1997)，另一方面以基因轉殖將基因轉入植株，也能創造新穎性狀之品種，加速育種速度，來創造出葉窗帶有獨特花紋之品種以提高商品價值。

- 
- 1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生。
  - 2) 國立中興大學園藝學系助理教授。
  - 3) 國立中興大學園藝學系助理教授，通訊作者。

## 材料與方法

### 一、抗生素濃度測試

#### (一) Cefotaxime 濃度測試

'三仙壽'癒傷組織作為實驗材料，約 0.05 g 培植體，培養於加有 3%蔗糖 (Duchefa Biochemie)及 0.8%洋菜粉 (Cyrusbioscience)的 MS 培養基 (Murashige and Skoog, 1962)，另外加有 0、100、200、300 及 400 mgL<sup>-1</sup> cefotaxime (cyrusbioscience)，置於 600 lux 與 5500 lux 光環境下，生長溫度 26°C、光週 16 hr。每盤 15 個培植體，每處理 5 重複，培養八週後觀察培植體生長情形。八週後計算培植體面積與初始面積之倍率。

#### (二) Hygromycin 濃度測試

'三仙壽'增殖的癒傷組織作為材料，約 0.05 g 之癒傷組織為一份培植體，培養於全量 MS 培養基添加 3%蔗糖與 0.8%洋菜粉，以 0、5、10、15、20 mgL<sup>-1</sup> hygromycin (Cyrusbioscience)進行濃度試驗，分別培養於 600 lux 與 5500 lux 光環境下，生長溫度 26°C、光週 16 hr。每盤有 5 份癒傷組織，每處理 5 重複，培養五週後觀察培植體生長情形。計算出五週後褐化百分比。

### 二、'三仙壽'農桿菌轉殖流程

以攜帶含 GUS 基因之 pCAMBIA1305.1 質體 (CAMBIA)之 LBA4404 農桿菌、及不帶有轉殖基因載體之 LBA4404 農桿菌與水為對照組進行感染。農桿菌培養於分別含 50 mgL<sup>-1</sup> kanamycin 或 50 mgL<sup>-1</sup> streptomycin 之 YEP 菌盤上，取單一菌落後分別培養於添加抗生素之 YEP 養液中，以 28°C 125 rpm 培養 2 天，再於菌液中加入 100 μM acetosyringone (AS) 繼續培養 4 小時後，菌液以 5000×g 離心 4 分鐘，去除上清液，加入含 100 μM acetosyringone (AS) 的 1/2MS 培養液，懸浮農桿菌至 OD<sub>600</sub> 為 0.2 作為感染液。'三仙壽'癒傷組織分別與農桿菌共同培養 10 分鐘，癒傷組織於無菌擦手紙上晾乾後共培養 4 天後洗去多餘農桿菌。癒傷組織培養於添加 250 mgL<sup>-1</sup> cefotaxime 之培養基，置於 26°C、光週 16 hr、600 lux 或 5500 lux 下，培養八週後，將癒傷組織至於含有 5 mgL<sup>-1</sup> hygromycin 的培養基進行篩選 12 周 (圖 1)。

### 三、轉殖株 GUS 染色表現

感染農桿菌後之癒傷組織作為材料，將癒傷組織置於微量離心管中加入 X-Gluc (100 mM phosphate buffer pH = 7.0, 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA pH = 8.0, 0.5 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 0.5 mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 0.1% Triton X-100, 10% MeOH, 0.3% x-gluc)淹過培植體，以真空抽氣幫浦抽真空 3 分鐘重複三次，放置於 37°C 黑暗下反應過夜，使用 95%酒精重覆浸泡清洗去掉葉綠素，並觀察 GUS 顯色結果。

### 四、統計方法

試驗利用 SAS 9.4 (Statistics Analysis System)統計軟體，以 LSD (least significant difference)方式進行計算，分析試驗中各個處理是否有顯著差異。

## 結 果

### 一、抗生素濃度測試

#### (一) Cefotaxime 濃度測試

癒傷組織在 600 lux 光度下，於 0 - 400 mgL<sup>-1</sup> cefotaxime 培養基中培植 8 周後，約增殖 7.1-8.5 倍，於 5500 lux 光度下之約增值 8.8-11.4 倍，5500 lux 對癒傷組織之增生較佳。不論於 600 lux 或 5500 lux 下，癒傷組織在不同 cefotaxime 培養基的增生倍率無明顯差異，顯示，cefotaxime 濃度對癒傷組織生長狀況影響不大 (表 1)。

#### (二) Hygromycin 濃度測試

癒傷組織於 600 lux 5 mgL<sup>-1</sup> hygromycin 篩選至第三週時褐化率才達 6%，篩選速度雖然緩慢但癒傷組織生長已受到抑制，至第五週時褐化率大幅提升至 73%；處理 10-15 mgL<sup>-1</sup> hygromycin 之癒傷組織於第一週時褐化率為 20-26%，第三週時過半數褐化；20 mgL<sup>-1</sup> hygromycin 癒傷組織於第一週時褐化率高達 40%，第三週時癒傷組織已接近全數褐化。癒傷組織於 5500 lux 下篩選速度較 600 lux 快，在 5 mgL<sup>-1</sup> hygromycin 下第三週時癒傷組織褐化率為 53%，第五週時褐化率為 60%；於 10 mgL<sup>-1</sup> hygromycin 處理下第一週時褐化率為 46%，第三、五週之褐化率變動不大為 86%；癒傷組織於 15-20 mgL<sup>-1</sup> hygromycin 下培養至第三週時褐化率已達到 100% (表 2)。

表 1. 不同 cefotaxime 濃度及 600 or 5500 lux 光度培養下八週'三仙壽'癒傷組織增殖倍數。  
Cefotaxime 濃度為 0、100、200、300 或 400 mgL<sup>-1</sup>。

Table 1. The proliferation of *H. 'Sansenjyu'* calli cultivated by different concentrations of 0, 100, 200, 300, 400 mgL<sup>-1</sup> cefotaxime under 600 or 5500 lux for 8 weeks. N = 5.

光度 (lux)	Cefotaxime (mgL <sup>-1</sup> )				
	0	100	200	300	400
600 lux	8.56 ± 0.86 <sup>bcd</sup>	8.12 ± 1.09 <sup>bcd</sup>	8.16 ± 0.72 <sup>bcd</sup>	7.76 ± 0.14 <sup>cd</sup>	7.11 ± 0.48 <sup>d</sup>
5500 lux	9.41 ± 0.81 <sup>bc</sup>	9.27 ± 0.77 <sup>bc</sup>	11.46 ± 1.24 <sup>a</sup>	9.38 ± 0.36 <sup>ab</sup>	8.82 ± 0.87 <sup>bc</sup>

### 二、'三仙壽'農桿菌轉殖情形

癒傷組織感染流程如圖 1，癒傷組織受農桿菌感染後仍然呈現綠色，未受抗生素篩選培養八週後大量增殖 (圖 2A) 後，再進行 hygromycin 抗生素 (5 mgL<sup>-1</sup>) 篩選四周後大量死亡並嚴重褐化，少部分組織分化出小芽 (圖 2B)，小芽繼續篩選至第八週時部分芽體及其下位

葉出現白化 (圖 2C)，篩選持續至第十二週時芽體嚴重白化，少數芽體仍保持綠色，仍存活芽體之生長勢差 (圖 2D)。

表 2. 不同 hygromycin 濃度及 600 或 5500 lux 光度培養下五週 '三仙壽' 癒傷組織死亡百分比。Hygromycin 濃度為 0、5、10、15 或 20 mgL<sup>-1</sup>。

Table 2. The mortality rate of *H. 'Sansenju'* calli cultivated by different concentrations of 0, 5, 10, 15, 20 mgL<sup>-1</sup> hygromycin under 600 or 5500 lux for 5 weeks. n=5

光度 (lux)	Hygromycin (mgL <sup>-1</sup> )	癒傷組織死亡百分率 (Mortality rate of calli) (%)		
		1 Week	3 Week	5 Week
600	0	0 ± 0 <sup>k</sup>	0 ± 16.33 <sup>k</sup>	0 ± 32.66 <sup>k</sup>
	5	0 ± 24.94 <sup>k</sup>	6.67 ± 41.1 <sup>j</sup> <sup>k</sup>	73.33 ± 47.14 <sup>bcd</sup>
	10	20 ± 9.43 <sup>ij</sup>	66.67 ± 9.43 <sup>cde</sup>	86.67 ± 9.43 <sup>ab</sup>
	15	26.67 ± 9.43 <sup>hi</sup>	86.67 ± 41.1 <sup>ab</sup>	80 ± 28.28 <sup>bc</sup>
	20	40 ± 9.43 <sup>gh</sup>	100 ± 24.94 <sup>ab</sup>	100 ± 33.99 <sup>a</sup>
5500	0	0 ± 0 <sup>k</sup>	0 ± 0 <sup>k</sup>	0 ± 0 <sup>k</sup>
	5	0 ± 0 <sup>k</sup>	53.33 ± 0 <sup>efg</sup>	60 ± 9.43 <sup>def</sup>
	10	46.67 ± 47.14 <sup>fg</sup>	86.67 ± 28.28 <sup>ab</sup>	86.67 ± 18.86 <sup>ab</sup>
	15	46.67 ± 0 <sup>fg</sup>	100 ± 28.28 <sup>a</sup>	86.67 ± 24.94 <sup>ab</sup>
	20	80 ± 0 <sup>bc</sup>	100 ± 9.43 <sup>a</sup>	100 ± 9.43 <sup>a</sup>

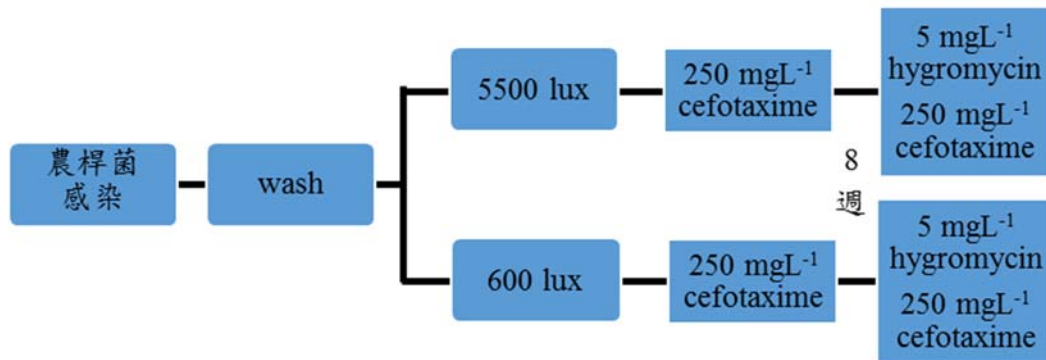


圖 1. '三仙壽' 癒傷組織農桿菌轉殖流程圖。

Fig. 1. *Agrobacterium*-mediated transformation flow diagrams of *H. 'Sansenju'*.

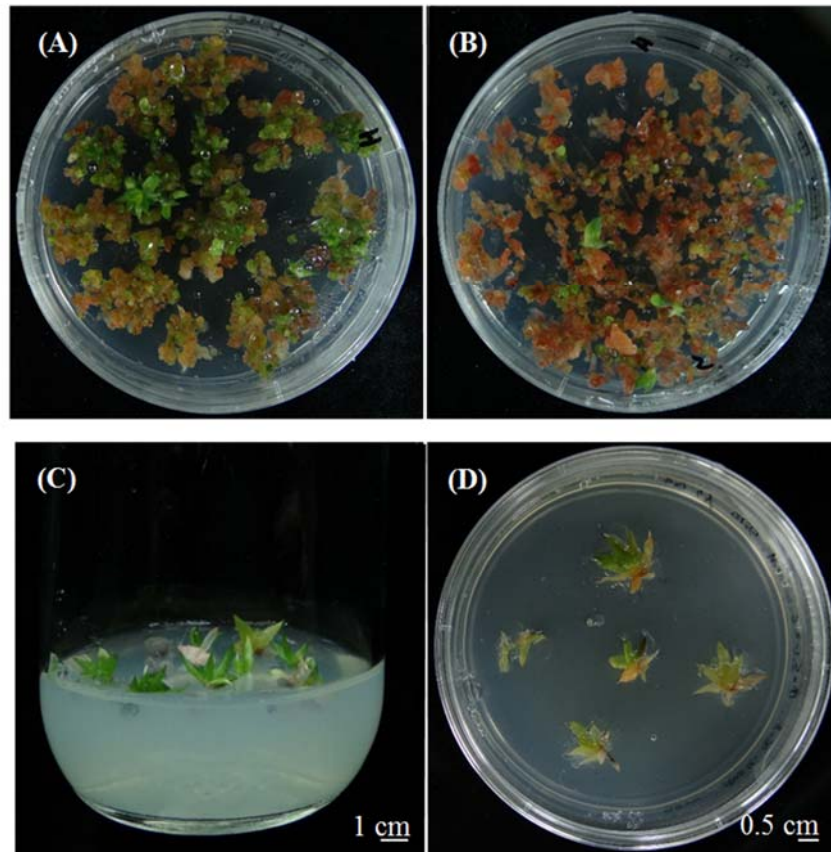


圖 2. 農桿菌轉殖培植體感染與篩選情形。(A) 培植體未篩選四週後之情形，(B) 培植體篩選四週後之情形，(C) 培植體篩選八週後之情形，(D) 培植體篩選十二週後之情形。  
Fig. 2. Effects of the infected and selection of *Agrobacterium*-mediated transformation flow diagrams 6. (A) The calli were cultivated for 4 weeks after *Agrobacterium* infected, didn't grow on the selection medium for 8 weeks. Calli cultivate on the selection medium for (B) 4 weeks, (C) 8 weeks, (D) 12 weeks.

### 三、轉殖株 GUS 染色表現

感染後分為 600、5500 lux、未經篩選與經篩選之培植體，進行 GUS 表現比較。以 H<sub>2</sub>O 或未帶轉基因之 LBA4404 農桿菌感染之再生植株皆無 GUS 表現 (圖 3A、B、E、F)。培養於 600 lux 下，無論是否利用 hygromycin 篩選之轉殖株皆沒有 GUS 反應 (圖 3C、D)，而在 5500 lux 下之轉殖株部分組織呈現藍色，成為嵌合體，成功表現出 GUS 基因 (圖 3G、H)，顯示本試驗利用'三仙壽'癒傷組織可成功獲得轉殖植物。

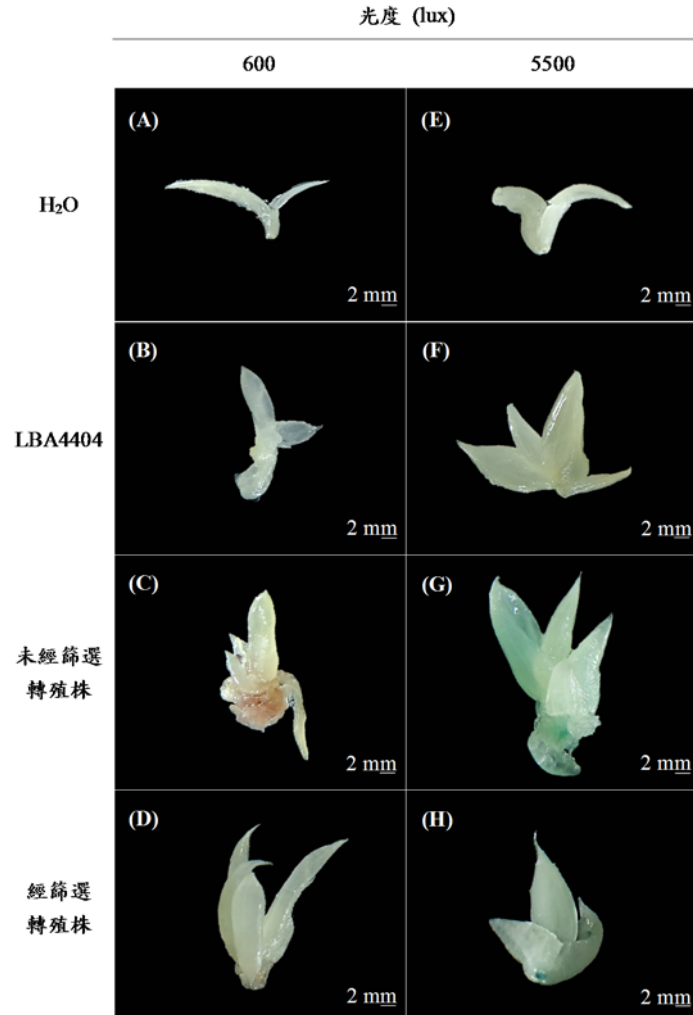


圖 3. 農桿菌轉殖後，培養於 600、5500 lux 下未經篩選、經篩選之轉殖培植體、H<sub>2</sub>O：未轉殖植株與轉殖 LBA4404 空載體農桿菌之 GUS 表現之情形。600 lux (A) H<sub>2</sub>O、(B) LBA4404 空載體農桿菌、(C) 未經篩選殖植株、(D) 經篩選殖植株；5500 lux (E) 未轉殖植株、(F) LBA4404 空載體農桿菌、(G) 未經篩選殖植株、(H) 經篩選殖植株。

Fig. 3. GUS histochemical analysis of the transformation plants. The plants were (A) H<sub>2</sub>O, (B) transformed by LBA4404 carrying no binary vector, (C) transformed but without selection, and (D) transformed and selected with hygromycin under 600 lux. (E) not transformed yet, (F) transformed by LBA4404 carrying no binary vector, (G) transformed but without selection, and (H) transformed and selected with hygromycin under 5500 lux.

## 討 論

'三仙壽'癒傷組織生長不受 cefotaxime 濃度之影響，此結果與百合科植物 *Agapanthus praecox* 對 cefotaxime 之反應類似 (Nauerby *et al.*, 1997; Suzuki *et al.*, 2002)，癒傷組織並無明顯褐化或白化出現，增殖倍數只有些微差異，故本實驗以能夠成功抑制 LBA4404 農桿菌生長之濃度  $250 \text{ mgL}^{-1}$  cefotaxime 進行後續試驗。Hygromycin 濃度篩選試驗中，5500 lux 下'三仙壽'癒傷組織褐化得嚴重，可能是因為癒傷組織較適合培養於低光照之環境 (賴，1980)，多肉植物在強光時會形成色素累積在植物體中，以保護葉肉組織不受傷害，造成培植體呈現紅褐色 (Li *et al.*, 2015)。Field 等人 (2013) 以 HPLC 分析植株內的代謝產物，發現在葉窗有花青素之前驅物的累積。'三仙壽'組織在高光下容易呈現紅褐色，如繼續進行培養，其生長之效率差幾乎不再增生，此現象與新疆蘋果癒傷組織在光照下容易累積花青素類似，而癒傷組織生長速率與花青素含量呈現負相關 (Wang *et al.*, 2016)，代表花青素含量越高癒傷組織生長速率越低。然而當 hygromycin 濃度為  $20 \text{ mgL}^{-1}$  時，無論是 600 或 5500 lux 褐化之培植體較其他濃度少，反而白化者較多，可能是組織內還未累積花青素等物質，就遭受抗生素篩選，使得癒傷組織死亡時呈現白色。

由試驗結果得知'三仙壽'癒傷組織適合以  $5 \text{ mgL}^{-1}$  hygromycin 光度 600 lux 進行篩選，篩選速率較為緩和，且未轉殖之癒傷組織幾乎無法再生，5500 lux 之培養環境篩選速率過快，擬轉殖株可能來不急再生就死亡。於 600 與 5500 lux 下於第五週時癒傷組織之死亡率大都有緩和或下降之現象，因為少量癒傷組織並未直接接觸培養基而存活下來，其於第五週時開始增生，使得死亡率下降，故之後進行篩選時需要四週繼代一次，以免未轉殖成功之組織開始增生。

觀察擬轉殖株 GUS 表現發現'三仙壽'癒傷組織呈現嵌合體，可能是因為感染後八週才進行篩選，之後只使用低濃度  $5 \text{ mgL}^{-1}$  hygromycin 進行抗生素篩選，過晚篩選導致未成功轉殖之細胞繼續分化形成嵌合體，應提早篩選時間，先以低濃度抗生素進行篩選，避免未轉殖成功之細胞再生，之後再將抗生素濃度提高 (王，2007)。

綜合以上實驗結果'三仙壽'轉殖應可利用  $\text{OD}_{600}$  為 0.2 之農桿菌進行基因轉殖，感染癒傷組織與感染液震盪培養 10 分鐘，共培養四天後去除多餘農桿菌後，於 600 lux 之環境，培養基添加  $250 \text{ mgL}^{-1}$  cefotaxime 先不進行篩選培養 2 週後，再以含  $5 \text{ mgL}^{-1}$  hygromycin 與  $250 \text{ mgL}^{-1}$  cefotaxime 培養基培養，四週後將篩選濃度提高至  $10 \text{ mgL}^{-1}$  hygromycin，直到癒傷組織開始帶胚性後，將培植體移至 5500 lux 下培養，應可降低嵌合體的比例，得到均質的'三仙壽'轉殖植株。

## 參 考 文 獻

- 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: 37-51。
- 吳亮宏。2011。*Haworthia* 屬植物以花莖為培植體之微體繁殖。國立嘉義大學碩士論文。85pp。
- 賴本智。易希道。1980。葡萄組織培養之研究:環境因子對葡萄癒傷組織生長及分化的影響。中華農業研究 29: 157-165。
- Christensen-Dean, G. A. and R. Moore. 1993. Development of chlorenchyma and window tissues in leaves of *Peperomia columella*. Ann. Bot. 71(2): 141-146.
- Field, K. J., R. George, B. Fearn, W. P. Quick, and M. P. Davey. 2013. Best of both worlds: simultaneous high-light and shade-tolerance adaptations within individual leaves of the living stone *Lithops aucampiae*. Public Library Sci. 8.
- Hayashi, M. 1987. Callus characteristics and classification of *Haworthia* and allied genera. S. Afr. J. Bot. 53(6): 411-423.
- Li, Y. C., T. C. Lin, and C. E. Martin. 2015. Leaf anthocyanin, photosynthetic light-use efficiency, and ecophysiology of the South African succulent *Anacampseros rufescens* (Anacampserotaceae). S. Afr. J. Bot. 99:122-128.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15(3): 473-497.
- Mycock, D. J., M.P. Watt, K. F. Hannweg, K. Naicker, M. Makwarela, and P. Berjak. 1997. Somatic embryogenesis of two indigenous South African *Haworthia* spp. (*H. limifolia* and *H. koelmaniorum*). S. Afr. J. Bot. 63(6): 345-350.
- 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(1-2): 169-177.
- Suzuki, S., M. Oota, and M. Nakano. 2002. Embryogenic callus induction from leaf explants of the Liliaceous ornamental plant, *Agapanthus praecox* ssp. *orientalis* (Leighton) Leighton: Histological study and response to selective agents. Sci. Hortic. 95(1-2): 123-132.
- Wang, N., Z. Y. Zhang, S. H. Jiang, H. F. Xu, Y. C. Wang, S. Q. Feng, and X. S. Chen. 2016. Synergistic effects of light and temperature on anthocyanin biosynthesis in callus cultures of red-fleshed apple (*Malus sieversii* f. *niedzwetzkyana*). Plant Cell Tissue Organ Cult. 127(1): 217-227.



## Establishment of the Regeneration and *Agrobacterium*-mediated Transformation System of Genus *Haworthia*

Ting-Wen Hou<sup>1)</sup> Yen-Ming Chen<sup>3)</sup> I-Chun Pan<sup>2)</sup>

Key words: *Haworthia*、calli、Hygromycin、Cefotaxime、*Agrobacterium* transformation、GUS

### Summary

*Haworthia* is a genus of succulent plants. Some species with leaf epidermal windows have been well accepted by people. Hybrid breeding were utilized for new varieties creation, but it was not easy and took a long time. To create new varieties and shorten the breeding time, *agrobacterium*-mediated transformation system of *Haworthia* succulents were established in this study. The results showed calli cultivated in selection medium by 5 mgL<sup>-1</sup> hygromycin under 600 lux, and 250 mgL<sup>-1</sup> cefotaxime. *Agrobacterium* LBA4404 strain carrying pCAMBIA1305.1 vector containing GUS gene were dilute to OD<sub>600</sub> of 0.2 and add to calli for 10 minutes. After co-culture for 4 days and remove *Agrobacterium* with 250 mgL<sup>-1</sup> cefotaxime. GUS expression were observed after infected were grown for 8 weeks and then transfer to selection medium containing 5 mgL<sup>-1</sup> hygromycin. Chimeric transgenic plants were obtained after 4 weeks selection.

---

1) Graduate student, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Assistant Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

3) Assistant Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

Corresponding author.

