

菊花花蕾培植體利用農桿菌轉殖 花色基因後之再生¹⁾

陳彥銘²⁾ 王強生³⁾ 朱建鏞⁴⁾

關鍵字：菊花、總花托、葉片、葉柄、農桿菌基因轉殖、再生

摘要：菊花‘Red Windmill’、‘Pink Flame’、‘Linker’、‘Margenta Linker’葉片培植體培養在含 hygromycin 之培養基時，當 hygromycin 濃度達 25 mg/L 時，死亡率達到 100 %；濃度為 20 mg/L 時，致死率仍達到 87 % 以上；濃度在 10 mg/L 時，除‘Margenta Linker’培植體致死率為 66 % 外，其他品種致死率均達到 80 % 以上。不同花蕾培植體型式轉殖花色基因後再生情況，發現以完整總花托再生芽體情況最佳，其次分別為包括總苞之花蕾上半部組織或總花托之上半部。但包括總苞組織，轉殖花色基因後培植體褐化率、農桿菌復發程度均為最高。以花瓣尖端著色但未超過 1 cm 的花蕾作為培植體，存活培植體數量較總苞未展開或花瓣伸長大於 1cm 者多。菊花器官培植體經農桿菌轉殖花色基因後，發現以花蕾培植體存活率較高，農桿菌復發率較低，再生芽體數量較多。培植體使用莖段或小花梗經農桿菌轉殖花色基因後，均無法再生芽體。‘Red Windmill’和‘Linker’轉殖花色基因後，每片花蕾培植體再生芽體數量分別為 0.76 與 0.33，高於葉片及葉柄培植體。

前 言

菊花基因轉殖已被廣泛研究，但其轉殖率很低，及品種差異性存在所造成運用上之不便，無法實際推廣運用 (Teixeira da Silva, 2003)。現今菊花基因轉殖之方法，多以葉片作為培植體來源，有農桿菌容易復發，感染後不易再生、轉殖率低落等缺失 (楊, 2003)。其他培植體種類雖有葉柄、莖段、花梗、小花培植體等 (Teixeira da Silva, 2003)，但各種培植體間，何種轉殖效率較高之比較卻未見文獻報導。為建立菊花農桿菌基因轉殖之平臺，

-
- 1) 本試驗承行政院農業委員會計畫補助，計畫編號農科-5.1.4-農 C7。
 - 2) 國立中興大學園藝學系碩士班學生。
 - 3) 國立中興大學農藝學系副教授。
 - 4) 國立中興大學園藝學系教授，通訊作者。

必須確立穩定且再生容易之培植體種類。本試驗以菊花花蕾為培植體轉殖花色基因，期能改善轉殖效率、和創造具新穎花色的品種。

材料及方法

一、試驗材料

(一)試驗品種：

本試驗使用 4 個多花型菊花品種，花色種類如下：1. 'Red Windmill'：主色白色，紅色覆輪；2. 'Pink Flame'：主色紅色，白色覆輪；3. 'Linker'：粉紅色；4. 'Margenta Linker'：白色，為'Linker'之變異種。

(二)培養基：

本試驗之基本培養基含 MS 商業配方(Murashige and Skoog Basal Medium, Plant Cell Culture Tested, Sigma Chemical, Mo., U.S.A)4.4 g/l、蔗糖(台糖細粒特砂)30 g/l、以及洋菜(Difco Bacto-Agar)7 g/l。生長調節劑則依培養目的而異。在建立瓶內無菌材料、癒傷組織培養、芽體再生培養、芽體伸長培養、或發根篩選培養時，其基本培養基分別添加 BA 2.5 mg/l 和 IAA 1 mg/l；IAA 5mg/l、BA 10 mg/l、2,4-D 1mg/l；BA 2 mg/l；IAA 0.1mg/l 或 IAA 1mg/l(張，2000)。培養基以 0.1N NaOH 或 0.1N HCl 調整 pH 值至 5.7±0.1 後，經置 121°C 高壓滅菌釜滅菌 15 分鐘。

培養基經滅菌後，置無菌操作臺內操作，於培養基 60°C 時添加殺菌抗生素 carbencillin(Carbencillin disodium, Sigma Chemical, Mo., U.S.A)600 mg/l 與不同濃度(mg/l)之篩選抗生素 hygromycin (Hygromycin B, Streptomyces sp., Merck KgaA, Darmstadt, Germany)。經混合均勻後分裝至 9 cm 培養皿中，容量約為 25 ml/皿。待培養基凝固後，以石蠟膜封口備用。

二、組織培養與基因轉殖系統

(一)組織培養方法：

(1)瓶內無菌材料之建立：

材料之品種為'Red Windmill'、'Pink Flame'、'Linker'、及'Margenta Linker'。取莖頂 2 cm 長，去除所有展開葉，以 1 %次氯酸鈉，添加數滴 Tween 20，震盪消毒 15 分鐘，於無菌操作臺內以無菌水淋洗三次，並切除白化組織。之後將其置入培養基中，以建立試驗用材料。

(2)瓶內葉片、葉柄、莖段培養：

取前述所建立之 4 品種瓶內植株，將植株分成葉片、葉柄、莖段三部分做為培養材料。葉身培植體之獲得，首先將葉柄去除，並將葉身部分切成 1 cm x 1 cm 之大小，為一培植體單位。葉柄培植體之獲得，來自上述之方法，並將葉柄統一切成 1 cm 之大小。莖段取

長度約為 1 cm 之片段，並去除多餘殘留葉柄組織及去除腋芽。葉片、葉柄培養是將上表皮朝上；莖段培養是將培植體片段橫放置於培養基，使培植體置於癒傷組織培養基中，使傷口邊緣稍微沒入培養基，以誘導癒傷組織生長。

(3)花蕾及花梗培養：

舌狀花已著色，但尚未完全開放之‘Red Windmill’、‘Pink Flame’、‘Linker’花蕾為材料。去除最外側之總苞，並依前述之建立無菌材料之消毒步驟滅菌。切除剩餘總苞片，切下花梗，並去除花托上之小花，即可獲得無菌之完整總花托。總花托切口朝下，放置於癒傷組織培養基上，以誘導癒傷組織之生成。花梗取長度約為 1 cm 之片段，去除多餘部分，培養方法及消毒方法如上述。

(二)農桿菌基因轉殖方法

(1)轉殖載體與農桿菌品系：

本試驗所使用之色素基因片段為 F3’5’H (NCBI: AAM51564)、ANS (NCBI: AY382828) 二種基因 cDNA 分別構築於 pCAMBIA 1300 轉殖載體中。pCAMBIA 1300 上構築的篩選標誌為 hpt 基因。所使用之農桿菌為二元 Ti 載體(binary Ti vector)的 EHA105 農桿菌系。

(2)農桿菌培養製備：

於感染前一天取單一菌落農桿菌接種於 50 ml 含適當抗生素的液態葡萄糖酵母液體培養基(yeast extract broth, YEB)(10 g/l peptone, 1 g/l yeast extract, 10 g/l beef extract, 10 g/l sucrose 及 2 g/l MgSO₄)中，於 28°C 黑暗環境中以 250 rpm 震盪培養 16-18 小時，當光吸收值 600(OD600 值)菌液濃度約為 0.4-0.6 時，添加 200μM 乙酰丁香酮(acetosyringone, AS)於菌液中，繼續培養 4-6 小時，收集菌液以 4000 rpm 離心 10 分鐘，倒除上清液後，以含 200μM AS 的 50 ml 之 MS 液態培養基(pH 值為 5.2)置換，其 OD600 值約為 0.8-1.0 時，若濃度太高則以 MS 液態培養基進行稀釋再進行感染。

(3)轉殖方法：

取菊花瓶內葉片(1x1cm)、葉柄、莖段、田間經消毒之總花托、小花梗為培植體，先於癒傷組織培養基中預培養 1 天，以便進行農桿菌基因轉殖試驗。取構築於 pCAMBIA 1300 轉殖載體中 F3’5’H 或 ANS 基因的農桿菌菌液 10 ml 與葉片浸泡感染 30 分鐘，再移入添加 1 ml 癒傷組織液體培養基之濾紙的培養皿中，放置於 25°C 培養室暗培養 2 天後，即完成感染。

(三)培養室環境條件：

培養室溫度調節在 25±3°C，並以冷白日光燈(旭光日光燈，台灣日光燈公司)提供 35±8 μ mols-1m-2 的光合光子流密度(Photosynthetic Photon Flux Density, PPF)。光週期設定為明期 16 小時，暗期 8 小時。

三、試驗方法

(一)篩選抗生素 hygromycin 對菊花葉片致死濃度之測試

使用‘Red Windmill’、‘Pink Flame’、‘Linker’、‘Margenta Linker’瓶內植株，所獲得之

葉身培植體(1x1cm)，做為致死率之培養材料，培養在含有 5、10、15、20、25(mg/l)不同濃度 hygromycin 之癒傷組織培養基中進行測試。每一處理共 50 片葉身培植體。評估篩選抗生素 hygromycin 對未轉殖培植體之致死濃度劑量，以建立篩選濃度門檻。

(二)花蕾培植體型式對轉殖後再生之影響

將消毒之‘Red Windmill’、‘Pink Flame’花蕾以下列方式切割成不同培植體型式，進行轉殖 F3’5’H 基因後之培養：(1)去除小花及總苞：(a)完整總花托、(b)完整總花托橫切之上部(c)完整總花托橫切之下部。(2)去除小花未去總苞：(a)花蕾橫切之上部、(b)花蕾橫切之下部(圖二)。以上培植體培養於含有 5 mg/l hygromycin 之癒傷組織培養基中。試驗每一重複 10 片培植體，進行三重複。

(三)菊花花蕾成熟度對轉殖後再生之影響

取‘Red Windmill’、‘Pink Flame’不同成熟度花蕾之總花托組織，進行轉殖 ANS 基因後之培養。將花蕾成熟度分為：(1)總苞未張開(2)總苞打開花瓣尖端著色未超過 1 cm(3)總苞打開花瓣尖端著色超過 1 cm。以上培植體培養於含有 5 mg/l hygromycin 之癒傷組織培養基中。試驗每一重複 10 片培植體，進行三重複。

(四)菊花培植體種類對轉殖後再生之影響

使用菊花品種‘Red Windmill’和‘Linker’。培養之培植體分別以瓶內植株之葉身、葉柄、莖段、及取自於田間小花梗、花蕾之總花托組織。‘Red Windmill’轉殖 F3’5’H 基因，‘Linker’則轉殖 ANS 基因。然後培養於含有 10 mg/l hygromycin 之癒傷組織培養基，之後再移至相同 hygromycin 濃度之芽體再生培養基中。瓶內葉身、葉柄、莖段每一重複 50 片培植體；小花梗及總花托每一重複為 15 片培植體。試驗進行三重複。

四、調查項目

所有轉殖試驗皆於轉殖後，每四週調查褐化率(培植體組織未膨大且呈現褐化現象，或培植體滲出褐色液體)、農桿菌復發率(農桿菌覆蓋培植體面積達 50%以上)、形成癒傷組織培植體數量、形成再生芽體之培植體數量、再生芽體數量。

五、試驗設計與統計分析

組織培養轉殖試驗採完全逢機設計(Complete Randomized Design)，每處理 3 重複。試驗結果進行鄧肯氏多變域分析(Duncan’s Multiple Range Test)，比較其 5%的顯著差異性。

結 果

(一)篩選抗生素 hygromycin 對菊花葉片致死濃度之測試

以瓶內培養的葉片，測試四個菊花品種‘Red Windmill’、‘Pink Flame’、‘Linker’及、‘Margenta Linker’，對 hygromycin 的致死濃度。各品種的葉片在不含 hygromycin 培養基上培養，均無褐化情形發生，生長情況良好，培植體膨大，於傷口及葉片表面可形成癒傷組

織。培養基含 hygromycin 濃度 5 mg/l 時，‘Red Windmill’、‘Pink Flame’、‘Linker’、及‘Margenta Linker’，褐化比例分別為 80%、73%、80%，及 0%。且僅於‘Linker’發現可形成少量癒傷組織。hygromycin 濃度增至 10 mg/l 時，‘Red Windmill’、‘Pink Flame’、‘Linker’，及‘Margenta Linker’，褐化比例分別提升至 87%、80%、87%，及 66%。所有品種皆無癒傷組織形成，培植體也無膨大之情況。培養基 hygromycin 濃度為 15 mg/l，發現‘Red Windmill’褐化比率已達到 100%，而‘Pink Flame’、‘Linker’，及‘Margenta Linker’之褐化率分別為 87%、87%，及 80%。培養基 hygromycin 濃度 20 mg/l 時，‘Red Windmill’、‘Pink Flame’、‘Linker’，及‘Margenta Linker’褐化比例分別為 100%、90%、87%，及 100%，已達 90%之致死比例。培養基 hygromycin 濃度高達 25 mg/l 時，所有品種褐化比率已達到 100%(表一)。

(二)花蕾培植體型式對轉殖後再生之影響

為增加切口面積以增加農桿菌感染之機率，故將花蕾切割視其對於轉殖後再生之影響(表二)(圖一)。試驗結果發現‘Red Windmill’花蕾轉殖 F3’5’H 基因後，褐化率以總花托之上半部最低，為 0%，其餘褐化程度漸增分別為未去總苞之花蕾之上部、完整總花托、去除總苞之總花托橫切之上半部、未去總苞之花蕾橫切下半部。復發程度以未去總苞之花蕾橫切下部情況最為嚴重，有 30 % 的比例。存活率以去除總苞總花托之上半部、去除總苞之總花托、以及未去總苞之花蕾存活率較佳，有 80 % 以上之存活比例。再生芽體數量仍以前述三種處理再生較多。整體評估對於‘Red Windmill’轉殖後，以不含總苞部分之花蕾處理較佳。

‘Pink Flame’轉殖後，發現褐化程度與‘Red Windmill’轉殖 F3’5’H 基因後情況類似。而復發程度較低之處理為去除總苞之完整總花托及總花托橫切之上半部，分別為 6.7 % 與 10

表 1. 菊花葉片培植體對 hygromycin 之致死率(%)

Table 1. Lethal rate of chrysanthemum leaf explant to hygromycin.

Hygromycin (mg/L)	Lethal rate (%) ^z			
	‘Red Windmill’	‘Pink Flame’	‘Linker’	‘Margenta Linker’
0	0	0	0	0
5	80	73	80	0
10	87	80	87	66
15	100	87	87	80
20	100	90	87	100
25	100	100	100	100

z : average of 50 leaf explants.

%。存活率以去除總苞完整之總花托之上半部、去除總苞之總花托、以及未去總苞之花蕾存活率較佳，分別有 90 %、90 %、及 83.3 %。再生芽體部分也以此三種處理再生芽體數量較多。整體評估花蕾經由不同切割方式，經轉殖再生之情況，以未含有總苞組織其存活比例較高、再生芽體數量較多、褐化與農桿菌復發比例較低。

(三)菊花花蕾成熟度對轉殖後再生之影響

‘Red Windmill’經轉殖 ANS 基因後，發現以總苞打開，花瓣尖端著色未超過 1 cm 其褐化程度最低，褐化程度為 3.3 %，其次分別為花蕾未開以及總苞開放，花瓣尖端著色超過 1 cm，褐化比例分別為 6.6 %與 23.3 %。復發程度三種處理並無明顯差異，皆低於 3.3 % 以下。培植體存活比例最高為花瓣尖端著色未超過 1 cm，有 97 %。其次為總苞未開之處理，存活比例為 90 %。再生芽體數量也以此兩處理較多(表三)(圖二)。

於‘Pink Flame’轉殖 ANS 基因試驗觀察到其褐化程度無明顯差異，皆低於 16 %。但以花瓣尖端著色未超過 1 cm 之處理褐化程度最低，僅 6.6 %。相同觀察到復發比例無明顯差異，但仍以花瓣尖端著色未超過 1 cm 之處理復發程度最低，為 0 %。存活培植體比例以花瓣尖端著色未超過 1cm 之處理最高，有 93 %，其次為總苞未打開以及總苞打開，花瓣尖端著色超過 1cm，比例分別為 83.3 %與 80.0 %。再生芽體數量部分以花瓣尖端著色未超過 1cm 之處理最高，平均每個培植體可再生 0.5 個芽體(表三)。

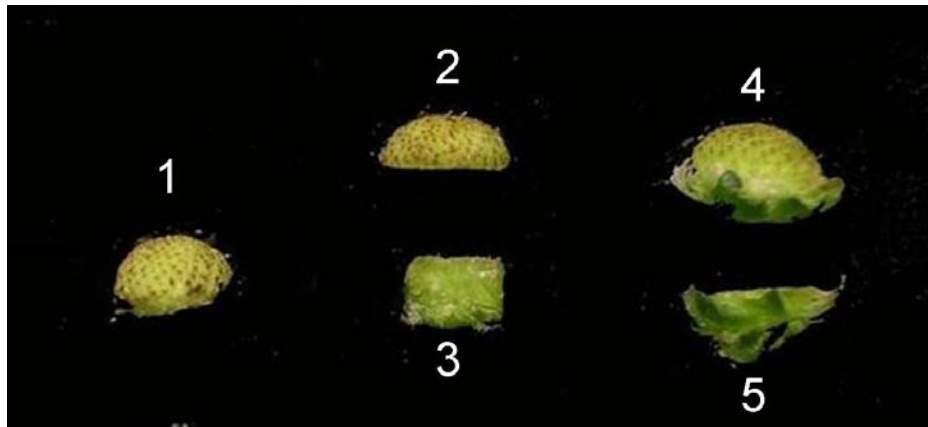


圖 2. 菊花花蕾培植體型式；(1)去除小花及總苞：完整總花托，(2)去除小花及總苞後：總花托之上半部，(3)去除小花及總苞：總花托之下半部，(4)去除小花未去總苞：花蕾之上半部，(5)去除小花未去總苞：花蕾之下半部

Fig.2. Explant types chrysanthemum bud for experiment. Remove florets and involucre from receptacle(1)full receptacle,(2)the upper halves of receptacle,(3)the lower halves of receptacle ; Remove florets and kept involucre(4)the upper halves of flower bud,(5)the lower halves of flower bud.

表 2. 菊花花蕾培植體型式對轉殖後再生之影響^z

Table 2. Effect of chrysanthemum flower bud explant's types on shoot regeneration after *Agrobacterium*-mediated transformationz.

Bud treatment ^y	Browning (%)	Relapsing (%)	Survival rate(%) ^x	Total regenerated shoots ^w
1	10.0 c	10.0 b	80.0 a	15
2	0.0 c	3.3 b	96.6 a	8
3	33.3 b	16.6 b	50.0 b	1
4	3.3 c	10.0 b	86.6 a	10
5	66.6 a	30.0 a	3.3 c	0
	'Pink Flame' ^v			
1	3.3 c	6.6 c	90.0 a	32
2	0.0 c	10.0 c	90.0 a	27
3	30.0 b	36.6 a	33.3 b	5
4	3.3 c	13.3 bc	83.3 a	24
5	60.0 a	30.0 ab	10.0 c	0

v: culture medium : containing 5 mg/l hygromycin.

w: total explants: 30 receptacle explants.

x: transgene : *F3'5'H*

y: Remove florets and involucre from receptacle(1)full receptacle,(2)the upper halves of receptacle,(3)the lower halves of receptacle ; Remove florets and kept involucre(4)the upper halves of flower bud,(5)the lower halves of flower bud.

z: means with the same letters in a column are not significantly different by Duncan's multiple range test at 5% level.

(四)菊花培植體種類對轉殖後再生之影響

本試驗將構築含有 flavanone 3'5'-hydroxylase(*F3'5'H*)或 anthocyanidin synthase(*ANS*)質體之農桿菌分別轉殖至 'Red Windmill' 與 'Margenta Linker'。評估不同器官培植體對於轉殖農桿菌後，再生之情形。'Red Windmill' 經轉殖 *F3'5'H* 後，褐化率以小花梗比例最高，為 33%；復發率以來自瓶內莖段培植體為最高，為 73%；存活率以來自瓶內培養之葉柄培植體最高，其次依序分別為葉身、花蕾、莖段、小花梗，存活比例分別為 79%、66%、64%、27%，及 13%。然而在再生芽體上，每片培植體再生芽體數最多為花蕾培植體，

每一培植體可再生 0.76 個芽體，而葉身及葉柄培植體再生芽體數量每一培植體分別為 0.18 及 0.13。‘Margenta Linker’轉殖 ANS 基因後，同樣以花蕾培植體存活能力最佳，達 78%，復發率與褐化率分別為 18%、5%，遠低於葉身培植體之復發與褐化比例。而每片培植體芽體再生數量，可再生 0.33 個芽體，遠高於葉身培植體 0.07(表四)。

討 論

一般植物體受傷時，表皮組織變為褐色甚至於黑色。此褐化現象與酚類化合物的多寡、多酚氧化酵素的含量與活性有關。培植體的種類、大小、部位，與培養環境均會影響褐化的程度。不同季節所採的培植體其褐化反應也不同(Wang et al., 1994)。不同培植體部位成熟度不同，其酚類化合物含量也隨之變化。Thomsa 與 Ravinda(1997)發現芒果‘Alphonso’與‘Totapuri’品種，枝梢成熟度為一週時酚類含量最高，隨著枝梢老化，酚類化

表 3. 菊花花蕾成熟度對於轉殖後再生之影響

Table 3. Effect of bud maturity on chrysanthemum shoot regenerated after *Agrobacterium*-mediated transformation^z.

Stage of bud maturity ^y	Browning (%)	Relapsing (%)	Survival rate (%) ^x	Total Regenerated shoots ^w
‘Red Windmill’ ^v				
1	6.6 b	3.3 a	90.0 a	5
2	3.3 b	0.0 a	96.6 a	3
3	23.3 a	3.3 a	73.3 b	0
‘Pink Flame’ ^v				
1	10.0 a	6.7 a	83.3 a	7
2	6.6 a	0.0 a	93.3 a	15
3	16.6 a	3.3 a	80.0 a	12

v: culture medium : containing 5 mg/l hygromycin.

w: total explants: 30 buds.

x: transgene : ANS

y: Stage of maturity : (1)tight flower,(2)involucre is opening and the colored ray florets less than 1 cm,(3)involucre is opening and length colored ray florets over than1 cm.

z: means with the same letters in a column are not significantly different by Duncan's multiple range test at 5% level.



圖 2. 菊花花蕾成熟度；花蕾成熟度分為：(1)總苞未張開。(2)總苞開放花瓣尖端著色未超過 1 公分。(3)總苞開放花瓣尖端著色超過 1 公分。

Fig 2. Bud maturity on chrysanthemum for experiment. Stage of maturity : (1)tight flower, (2)involucre is opening and the colored ray florets less 1 cm, (3)involucre is opening and colored ray florets over 1 cm.

合物急遽減少。不同芒果品種之間酚類化合物含量也會有所差異，發現‘Totapuri’ 品種其酚類化合物含量較‘Alphonso’高。Wang 等(1994)發現蘋果‘Fuji’和梨‘Jinhua’不同季節莖頂培養褐化情形，以 4 月到 9 月培植體褐化情形達約 100%，10 月到 3 月則褐化情形漸緩，認為與植株生理狀態有關，可能在休眠期培植體其含苯丙胺醯裂解 (phenylalanine ammonia-lyase, PAL)活性較低，所以發生褐化的情形較少。Zambre 等(2003)發現進行組織培養時可預先測量其不同生長階段酚類化合物的含量，或進行遮光處理，可減少培植體褐化的發生，以減少培植體死亡率，因多酚氧化酵素活性與光線跟有關(Marks and Simpson, 1990)。本試驗以菊花 5 種培植體進行培養，其中以花蕾為持續分化發育之部位，又因總花托培養環境為包覆於總苞內條件，其受光程度較低，因此褐化程度較其他培植體部位低，培養後再生率也較高。

Zambre 等(2003)認為酚類物質也影響著轉殖效率。根據趙等人(2005)，發現並非所有酚類物質都對轉殖皆有促進之功能。植物受傷細胞所分泌的某些酚類物質對於致毒基因(virulence gene, *vir*)有誘導功能。不同酚類化合物種類，對於結球白菜子葉基因轉殖效率之

表 4. 轉殖後菊花培植體再生率之比較^z。Table 4. Regeneration of chrysanthemum explant after *Agrobacterium*-mediated transformation^z.

Explant	Browning (%)	Relapsing (%)	Survival (%) ^y	Regeneration ^x
Red Windmill' / F3'5'H gene				
Blade	0	34.0±4.0	66.0±4.0	0.18
Petiole	0	21.0±2.2	79.0±2.2	0.13
Stem	0	73.0±3.8	27.0±3.8	0
Receptacle	22.2±5.0	13.3±3.3	64.4±5.0	0.76
Pedicle	33.3±8.8	53.3±6.7	13.3±3.2	0
'Linker' / ANS gene				
Blade	31.3±1.6	24.7±2.5	44.0±3.0	0.07
Receptacle	4.5±1.9	17.7±3.8	77.7±1.9	0.33

x: shoots per explant.

y: values represent the mean (\pm standard error) of three replicates. Each replicate consists of 50 explants of leaf, petiole, and stem, or 15 explants of receptacle, and pedicle.

z: culture medium : containing 10 mg/l hygromycin.

影響也不盡相同。發現乙醯丁香酮、阿魏酸、 p -羥機苯甲酸、芥子酸沒食子酸對於轉殖效率皆有一定的促進效率。但丁香酸、香草醛促進效果不明顯。而鄰苯二酚會使植物組織逐漸褐化死亡(趙, 2005)。因此推測不同培植體部位, 酚類化合物種類也不盡相同。

根據 Ando 和 Murasaki (1983)發現使用白化葉柄可完全除去微生物的生長, 並獲得高芽體再生能力(僅有 12% 污染)。而未白化處理培植體, 則有 83% 的污染。而 Murasaki 和 Tsrushima (1988)同樣指出白化葉柄能夠有效控制仙客來內生菌污染, 並達到高度再生的能力。使用白化處理的母株材料, 為一種可控制內生菌污染的方法之一。本試驗中花蕾培植體為包覆於總苞內的器官, 與白化作用效果相同, 其受光較少, 因此農桿菌復發程度較低。抑或是農桿菌菌液殘留於總苞組織造成殺菌不易, 導致含有總苞組織之花蕾培植體農桿菌復發程度較高之緣故。

Nhut 等(2001)測試鐵砲百合不同器官瓶內培養其芽體再生能力, 發現花托有 100% 的存活率, 且有較高的芽體產生速率。但是子房器官在培養 45 天內會死亡且僅會輕微的增長, 但不會形成任何的芽體。Nhut 等(2001)同時指出此暗示了花托組織含有相對高量的內生 cytokinin 類。另於 Karam 與 Majathoub(2000)仙客萊微體繁殖, 其幼嫩葉片芽體再生最佳, 而較老的葉片再生能力下降。並發現葉柄培植體有較高再生能力。

培植體大小也會影響再生能力。Nhut 等(2001)利用鐵砲百合不同長度之花托組織片

段，分別處理培植體 1~5 mm 長度進行培養，發現在花托組織為 3 mm 長度時，是產生最高數量之培植體長度，其每片培植體可產生高達 41 個芽體。隨著培植體長度的漸增或漸減，其培植體再生芽體數量逐漸減少。Karam 與 Majathoub(2000)針對野生仙客來成熟組織再生能力進行測試。發現當葉柄培植體長度超過 30mm 長度會抑制再生。這似乎顯示了芽體形成並不只是依靠在不同形式的賀爾蒙，同樣受到培植體大小的影響。因此本篇試驗針對花蕾切割方式進行轉殖(表二)，發現還是以總花托橫切之上半部存活能力最佳，但芽體再生數則以完整總花托為多。可能因為完整總花托，其有相對較多再生面積。

菊花花蕾成熟度對於轉殖後再生之影響，發現其再生芽體能力不盡相同(表三)。轉殖組織之部位、生育株齡均會影響轉殖效率。幼嫩組織較成熟組織對於農桿菌來得敏感，而再生容易的組織也是優良的接種材料。分裂旺盛之細胞較易被轉殖成功(Tzfira and Citovsky, 2002)。以發生學的觀點來看，分裂旺盛的細胞代謝活性較高，且其 DNA 複製期出現比率較高，較易接受外來基因的嵌入。另外幼嫩或分裂細胞有較多細胞壁結合位置供農桿菌依附，或是這些細胞經癒傷後會合成並釋出較高濃度的酚類化合物而活化了 vir 基因(詹與張，1991)。

Hattori(1992)證實菊花總花托細胞型態不同於葉片。總花托主要是由兩種型態的表皮細胞組成：大的表皮細胞覆蓋於厚的表皮細胞上。另一種相對較小的表皮細胞，則存在於小花與總花托之接合處，形成另一細胞層。發現總花托培養約六天後，可觀察到小型的表皮細胞開始細胞分裂。隨後這些細胞形成分生組織細胞團，並突出表皮。培養兩週後，細胞分裂仍持續進行，並有突起物突出；培養 16 天後，證實可見突起物為芽體；培養 20 天後，終於形成完整再生芽體。即總花托培養再生芽體是從小花與總花托之接合處的小型表皮細胞直接再生形成，不經過中間癒傷組織階段。因此可能是因為培植體細胞型態不同造成再生效率之差異。組織培養培植體再生能力為基因轉殖中影響轉殖效率之重要因素(De Jong et al., 1993)。本試驗以菊花 5 種器官培植體進行培養，發現總花托經轉殖後再生芽體最多。朱和江(2004)發現菊花微體繁殖再生系統中，以總花托培養產生芽體數量最多，速度最快。從再生率及變異率的觀點，利用花托培養之誘變方法明顯優於癒傷組織。

參 考 文 獻

- 朱建鏞、江純雅。2004。菊花組織培養之誘變育種。種苗科技成果發表會專輯：137-144。
- 楊淑蓉。2003。菊花基因轉殖之研究。國立高雄師範大學生物科學所碩士論文。臺灣：高雄。48 pp。
- 張淑芬、黃敏展。2000。菊花組織培養苗之變異。中國園藝 46：21-34。
- 趙軍良、遼保德、徐鴻林、朱禎、趙美華、梁愛華。2005。酚類化合物對大白菜遺傳轉化效率之影響。華北農學報 20：19-22。

- 詹明才、張新雄。1991。農桿菌轉殖系統之影響因素。科學農業 39：249-255。
- Ando, T. and K. Murasaki. 1983. *In vitro* propagation of cyclamen by the use of etiolated petioles. Technol. Bull. Fac. Hort. Chiba Univ. 32: 1-5.
- De Jong, J., W. Rademaker, and M. F. van Wordragen. 1993. Restoring adventitious shoot formation on Chrysanthemum leaf explants following cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Tissue Organ Cul. 32: 263-270.
- Hattori, K. 1992. The process during shoot regeneration in the receptacle culture of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.). Japan J. Breed. 42: 227-234.
- Karam N. S. and M. Al-Majathoub. 2000. *In vitro* shoot regeneration from mature tissue of wild *Cyclamen persicum* Mill. Sci. Hortic. 86: 323~333.
- Marks, T. R. and S. E. Simpson. 1990. Reduced phenolic oxidation at culture initiation *in vitro* following the exposure of field-grown stock plant to darkness or low levels of irradiance. J. Hortic. Sci. 65: 103-111.
- Murasaki, K. and H. Tsurushima. 1988. Improvement of clonal propagation of Cyclamen *in vitro* by the use of etiolated petioles. Acta Hortic. 226: 721-724.
- Nhut, D. T., B. V. Le, M. Tanaka, and K. T. T. Van. 2001. Shoot induction and plant regeneration from receptacle tissue of *Lilium longiflorum*. Sci. Hortic. 87: 131-138.
- Teixeira da silva, J. A. 2003. Chrysanthemum: advances in tissue culture, cryopreservation, postharvest technology, genetics and transgenic biotechnology. Biotechnology Advances . 21: 715-766.
- Thomas, P. and M. B. Ravindra. 1997. Shoot tip culture in mango: Influence of medium, genotype, explant factors, season and decontamination treatments on phenolic exudation, explant survival and axenic culture establishment. J. Hortic. Sci. 72: 713-722.3
- Tzfira, T. and V. Citovsky. 2002. Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*. Trends in Cell Biology 12: 121-129.
- Wang, Q., H. Tang, and G. Zhou. 1994. Phenol induced browning and establishment of shoot-tip explant of 'Fuji' apple and 'Jinhua' pear cultured *in vitro*. J. Hortic. Sci 69: 833-839.
- Zambre, M., N. Terry, J. De Clercq, S. De Buck, W. Dillen, M. van Moutagu, D. van Der Straeten, and G. Angenon. 2003. Light strongly promotes gene transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cell. Planta 216: 580-586.

Flower Bud as Explant for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated Transformation of Pigment Gene in Chrysanthemum.¹⁾

Yen-Ming Chen²⁾ Chang-Sheng Wang³⁾ Chien-Young Chu⁴⁾

Key words: Chrysanthemum, Receptacle, Leaf, Petiole, *Agrobacterium tumefaciens* – mediated, Regeneration

Summary

The lethal rate of leaf explants in Chrysanthemum 'Pink Flame', 'Red windmill', 'Margenta Linker' and 'Linker' was up to 100% when they were cultured in medium containing hygromycin at 25 mg/L. When hygromycin in medium decreased to 20 mg/L, the lethal rate was still over 87%. As well as they were cultured on 15 mg/L hygromycin medium, the lethal rate was over 80%, except 'Margenta Linker' explants (66%).

Floral explants with involucre were easier browning and relapsing than those without involucre. And the whole receptacle explants regenerated more shoots than parts of receptacle explants regenerated. In addition, flower bud with 1 cm ray florets had higher survival rate.

After transforming pigment gene by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated, flower bud explants were more survival and less relapsing, and regenerated more shoots. Each receptacle explant of chrysanthemum of 'Red windmill' and 'Linker' regenerated 0.76 and 0.33, respectively. The regeneration efficiency of receptacle was higher than leaf and petiole explant.

1) This experiment was support by Council of Agriculture, Executive Yuan: 94AS-5.1.4-CI-C7.

2) Graduate student in MS program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

3) Associate professor, Department of Agronomy, National Chung Hsing University.

4) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.

