

以農桿菌法轉移超氧化歧化酵素基因(*sod*)與 過氧化氫酵素基因(*cat*)到小白菜之研究

許家言¹⁾ 張有明²⁾ 曾夢蛟³⁾

關鍵字：小白菜、超氧化歧化酵素基因、過氧化氫酵素基因、農桿菌法基因轉移

摘要：本研究是利用農桿菌共同轉移法，同時轉移帶有 *rbcS* 為啟動子及攜帶有大豆葉綠體訊息 transit peptide 之結球白菜之超氧化歧化酵素 (*sod62*)及結球白菜之過氧化氫酵素 (*cat78*) 等二種基因至'台農二號'小白菜 (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* L. Makino)。其目的為建立小白菜之農桿菌基因轉殖系統，及探討利用基因轉殖技術培育出具有耐環境逆境及高品質小白菜的可行性。轉殖 *rbcS-TP-sod62* 與 *rbcS-TP-cat78* 基因到小白菜的子葉與下胚軸，於共同培養液中加入金鋼砂或添加 200 μ M 乙酰丁香酮，可提高基因轉殖效率。以 PCR 及 RT-PCR 分析共同轉殖 *rbcS-TP-sod62* 及 *rbcS-TP-cat78* 基因之小白菜的 T₁ 代後裔植株顯示，*sod* 及 *cat* 基因已遺傳到 T₁ 代小白菜並表現出其 mRNA。轉殖 T₁ 代小白菜葉片之 SOD 及 CAT 酵素活性均較未轉殖之對照組顯著增加，SOD 活性最高者約為對照組之 4.2 倍，CAT 活性最高者約為對照組之 2.2 倍。

前 言

小白菜，學名 *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* L. Makino，英名 Pak-choi，別名青菜、不結球白菜，長梗菜、雞毛菜、油白菜等，原產中國，已有數千年的栽培歷史，為中國江南各省的主要蔬菜，為十字花科 (*Cruciferae*) 莖苔屬 (*Brassica*) 的蔬菜。小白菜不挑剔氣候與土壤，栽培極為普遍，栽培期很短，夏季 2-3 星期即可採收，所以每次颱風過後，常是最先復耕上市的蔬菜。目前台灣地區小白菜栽培面積約 5,000 公頃，總種子用量約 37,500 公斤。由於小白菜的營養價值豐富，適合炒食、煮食與作湯等多種料理方式，深受消費者的喜愛 (林等，2004)。

-
- 1) 國立中興大學園藝學系博士班研究生。
 - 2) 環球科技大學生物科技學系助理教授。
 - 3) 國立中興大學園藝學系教授，通訊作者。

台灣地區夏季高溫多雨，每年五、六月的梅雨期，七至九月又有颱風的侵襲，高溫多濕的氣候環境造成葉菜類蔬菜生長發育不良、品質低落，加以病蟲害發生嚴重，導致產量降低，因而經常發生供需失調現象，價格變動劇烈(林等，2004)。由於台灣一般消費者偏好葉菜類，故如何穩定台灣夏季葉菜類之生產，實為當務之急。在許多植物生理方面的研究顯示，增加植物內生抗氧化酵素的活性，能提高其抗逆境的能力。因此培育出過量表現抗氧化酵素的轉殖植物，可能是快速獲得抗逆境的經濟作物之方法。所以近年來，轉移抗氧化系統酵素的基因，已成為植物抗逆境研究的重要方法(尤，2000)。

超氧化歧化酵素 (superoxide dismutase, SOD) 在植物防禦機制中扮演重要的角色，可將 O_2^- 反應生成 H_2O_2 (Alscher *et al.*, 1997)。SOD 的表現可受不同的氧化逆境所誘導 (Casano *et al.*, 1994)，且 SOD 去除 ROS 的能效依不同種類 SOD 所在位置不同而有差異 (Matters and Scandalios, 1986, 1987)。過氧化氫酵素 (catalase, CAT) 之作用主要是去除 H_2O_2 轉變成 H_2O 與 O_2 (Scandalios, 1993)。利用超氧化歧化酵素 (superoxide dismutase, SOD)、過氧化氫酵素 (catalase, CAT) 的抗氧化酵素系統來紓解氧自由基的危害，增加植物內生抗氧化酵素的活性，能提高其抗逆境的能力，已有許多報導 (Perl-Treves *et al.*, 1991)。本研究室已自結球白菜選殖到 *sod* 及 *cat* 基因，並對其基因特性有初步的瞭解 (尤和曾，2006)。

小白菜栽培歷史已久，有許多品種、變種、及地方品系。'台農二號' 為由台灣地方品種小白菜與喜樹白菜選拔葉色黃白者，自交純化五代而來，商品名為「金翠」，為行政院農業委員會農業試驗所於民國 92 年所育成；具葉色白、品質優、植株挺立、耐濕及耐熱之特性。本研究以'台農二號'為材料，建立其農桿菌基因轉殖系統，並嘗試將超氧化歧化酵素基因 (*sod*) 與過氧化氫酵素基因 (*cat*) 共同轉移至小白菜的葉綠體，其目的為探討利用基因轉殖技術培育出具有耐環境逆境及高品質小白菜的可行性。

材料及方法

一、試驗材料

(一)、基因轉移的植物材料

本試驗以'台農二號'小白菜為試驗材料。將供試種子經 70%酒精 30 秒與 1%次氯酸鈉 12 分鐘之表面滅菌後，無菌播種於含有 2%蔗糖與 1%洋菜膠之 MS 基本培養基 (Murashige and Skoog, 1962) 中供試驗使用。培養條件為 25/20°C (日/夜)，光強度為 $150\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，16 小時光週期。取無菌播種後第 3 天的子葉與下胚軸 (長度約 2mm) 作為進行農桿菌基因轉殖之材料。

(二)、轉移基因種類

本實驗作為小白菜基因轉移之基因為：1. 由'濱綠'結球白菜中篩選出的超氧化歧化酵素基因 (尤和曾，2006)：以 *rbcS* 為啟動子，及其帶有大豆葉綠體訊息 transit peptide 的 pKrtScn (吳，2002)；2. 由'濱綠'結球白菜中篩選出的過氧化氫酵素基因 (*cat78*) (尤和曾，

2006): 以 *rbcS* 為啟動子, 及其帶有 大豆葉綠體 訊息 transit peptide 的 pKrTCcn (吳, 2002), 共二種基因。其轉移的質體為: pKrTScn 與 pKrTCcn 二種轉殖載體 (圖 1), 轉殖之農桿菌品系為 *Agrobacterium tumefaciens* (LBA 4404)。

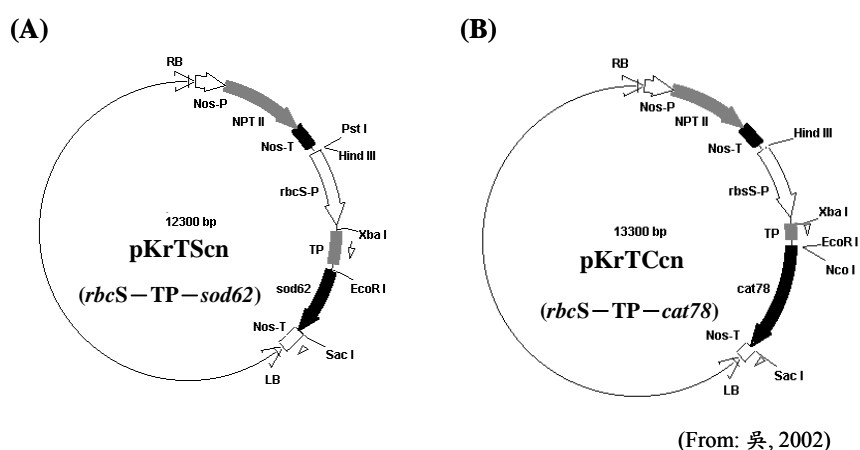


圖 1. pKrTScn (*rbcS*-TP-*sod62*) (A)、pKrTCcn (*rbcS*-TP-*cat78*) (B) 轉殖載體之限制酶圖譜。
Fig. 1. Restriction map of pKrTScn (*rbcS*-TP-*sod62*) (A) and pKrTCcn (*rbcS*-TP-*cat78*) (B).

二、試驗方法

(一)、三親交配 (Triparental mating)

本試驗所使用之農桿菌品系為 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, Help strain 為含有 pRK2013 質體之 HB101。依據 Rogers 等 (1987) 之方法, 將農桿菌 LBA4404 培養於 5 ml 含有 100mg/L streptomycin 之 LB 培養液, 於 28°C 培養 24~36 小時; 而 pRK2013 與 HB101/pKrTScn, HB101/pKrTCcn 或 HB101/pKrScn, HB101/pKrCcn 則分別培養於 5 ml 含有 50mg/L kanamycin 之 LB 培養液, 於 37°C 培養 12 小時。待三種菌液濃度於光電比色計波長 600 nm (OD₆₀₀) 的讀值為 0.6~0.8, 各取 1ml 菌液混合、離心, 將沉澱之菌體懸浮於 2ml 之 10mM MgSO₄。將此懸浮液過濾, 濾液收集於濾膜 (transfer membrane) (Immobilon™-Ny⁺) 上, 再將濾膜置於 antibiotics-free 之 LB 固體培養基上 (濾膜需緊密接觸固體培養基), 於 28°C 下隔夜培養後, 以 2ml 之 10mM MgSO₄ 將濾膜上之菌體溶出, 將溶出之菌液均勻塗佈於含有 50mg/L kanamycin 及 100 mg/L 之 streptomycin 之 M9 minimal medium (每公升含有 2mM Na₂HPO₄·7H₂O, 20mM KH₂PO₄, 8mM NaCl, 40mM NH₄Cl, 0.2% glucose, 2mM MgSO₄, 0.1mM CaCl₂), 於 28°C 培養 2~3 天, 長出之菌落即為三親交配之農桿菌, 可作為農桿菌感染基因轉移使用。

(二)、農桿菌基因轉殖法

切取種子發芽第三天的子葉與下胚軸(長度約2mm)，置於含有160 μ l 5% MES之MS液態培養基中，分別添加70~90 μ l 三親交配後的pKrTScn農桿菌液與pKrTCcn農桿菌液或添加70~90 μ l 三親交配後的pKrScn農桿菌液與pKrCcn農桿菌液共同培養(co-cultivate) 48~72小時，再以含有500~1000 mg/L carbenicillin 之 MS液體培養基浸泡30分鐘以殺滅農桿菌後，再將感染後的子葉或下胚軸培養於含有50 mg/L carbenicillin與 20 mg/L kanamycin 之選擇性分化再生培養基中，以篩選轉殖植株，每10天繼代培養於carbenicillin-free之20 mg/L kanamycin 之選擇性分化再生培養基中，待分化再生出不定芽後一週，再移至含有20mg/L kanamycin 之1/2MS(Murashige and Skoog, 1962)培養基使其繼續發育成長；試管內培養約30天左右，經由健化移出瓶外，種植於泥炭苔:蛭石:珍珠石=2:1:1之混合介質中，每天澆40mg/L kanamycin抗生素溶液以繼續進行篩選。

在利用葉綠體訊息勝肽轉移試驗中，為了提高農桿菌法的轉殖效率，在培植體與農桿菌液共同培養(co-cultivate) 時，進行以下的處理：(1) 菌液使用 90 μ l；(2) 菌液使用 180 μ l；(3)在共同培養液添加 200 μ M 乙酰丁香酮 (acetosyringone, AS)；(4)在共同培養液添加 1g 金鋼砂；(5)在共同培養液添加 200 μ M 乙酰丁香酮 (acetosyringone, AS) 與 1g 金鋼砂。本試驗並分別評估與比較以上五個處理之轉殖效率。

(三)、轉殖植株檢定

1. 基因的偵測及所用引子(primer)

偵測*sod*基因之引子為 primer 3：5'AGATCGGATCCAAGAA TGGTGAA 3'與primer 4：5'GTACGAGCTCCAGTACGGAGATTAAACG3'。偵測*cat*基因之引子為primer 5：5'CCAGAGCGTGTGGTTCATGCTAGAGGAGC3'與primer 6：5'GCTGCAGATAGTTTGG TCCAAGACGGTGTC3'。

2. 聚合酶連鎖反應(PCR 分析)

採用ERICOMP公司之Single block system型儀器進行PCR分析。PCR反應液之總體積為25 μ l，內含10 倍 *Taq* buffer(1x)，2.5 mM dNTPs (0.25mM)，5 unit TaKaRa *Taq* (TaKaRa Shuzo Co., LTD)，1 μ M核酸引子和100 ng之轉殖與未轉殖小白菜植物的葉片DNA。

PCR 反應條件為：94 $^{\circ}$ C (3 分鐘)，50 $^{\circ}$ C (1 分鐘)，72 $^{\circ}$ C (1 分鐘)，1 個 cycle，再進行94 $^{\circ}$ C (2 分鐘)，55 $^{\circ}$ C (50 秒)，72 $^{\circ}$ C (1 分鐘)，共 30 個 cycle，最後進行 72 $^{\circ}$ C (10 分鐘)，1 個 cycle。終產物抽出並濃縮至 20：1，以 0.8%之洋菜膠進行電泳分析。

3. 逆轉錄 PCR (RT-PCR 分析)

本試驗使用Qiagen OneStep RT-PCR Kit，此 Kit 兼具reverse transcription與 PCR amplification之組成，故通稱“one-step reaction”。採用ERICOMP公司之Single block system型儀器進行PCR分析。PCR反應液之總體積為25 μ l，內含有7.5 μ l template RNA, 1 μ l primer solution, 4 μ l 2.5mM dNTP mix, 2.5 μ l 5x Qiagen OneStep RT-PCR buffer，加入RNase-free water 至25 μ l，充分混合。

偵測基因的RT-PCR反應條件為：50°C (30分鐘)，94°C (3分鐘)，60°C (1分鐘)，72°C (1分鐘)，1個cycle，再進行94°C (2分鐘)，60°C (50秒)，72°C (1分鐘)，共30個cycle，最後進行72°C (10分鐘)，1個cycle。終產物抽出並濃縮至20:1，以0.8%之洋菜膠進行電泳分析。

(四)、Digoxigenin-dUTP 標記探針之製備

以聚合酶連鎖反應法 (polymerase chain reaction, PCR) 製備 digoxigenin 標識 (dig-dUTP-labeled) (Boehringer Mannheim, 以下簡稱 B.M.) 的非放射性 (non-radioactive) 探針，製備方法是依 Panaud 等人 (1993) 之操作，並略作修改 (林, 1995)；其中 Mg^{2+} 及 Taq 聚合酶 (polymerase) 的濃度係參考 Saiki (1989) 的結果。溶液總量是 100:1 [內含 1.5mM $MgCl_2$, 200 nM dig-labeling mix (dNTP)，引子各 60 μ M、Taq 5 unit (Protech)、pKrScn 質體 DNA 與 pKrCcn 質體 DNA 或 pKrTScn 質體 DNA 與 pKrTCcn 質體 DNA 各 1.5 ng (先經限制酶在 37°C，切割 3 小時)]，溶液表面以 50:1 礦物油覆蓋；其聚合酶連鎖反應機器為 ERICOMP 公司 (single block system)，其值的設定初期循環為變性 (denaturation) 94°C, 7 分鐘，鍊合 (annealing) 55°C, 1.5 分鐘，延伸 (extension) 72°C, 2.5 分鐘兩次；接著 94°C, 1.5 分鐘，55°C, 1.5 分鐘，72°C, 2.5 分鐘的循環重複 35 次，最後再一次 72°C, 10 分鐘。抽取下層液加入 10~1 3M sodium acetate, 2:1 glycogen (B.M.) 及 -20°C 無水酒精 120:1，混合均勻後置 -20°C 下過夜使 DNA 沉澱；再以 12000 rpm 離心 15 min，倒去上層液，用 100 ml 70% 酒精淋洗二次，並涼乾 DNA 後，最後將 DNA 溶在 100:1 的 TE buffer 中置 -20°C 備用。

(五)、抗氧化酵素活性的測定

1. SOD 酵素分析

總 SOD 活性的測定係根據 McCord 與 Fridorich (1969) 的方法。使用的分析儀器為 “Waters” model: 2487 紫外光/可見光光譜吸收儀偵測器。分析原理是利用 xanthine 與 xanthine oxidase (XOD) 作用合成的 O_2^- ，利用光譜吸收儀在波長 550nm 下記錄 SOD 酵素抑制 cytochrome c 之還原速率的數值。1 單位 SOD 定義為能夠抑制 cytochrome c 還原速率的 50% 的酵素量。反應溶液包含 0.1 ml 植物粗酵素萃取液與 1.9 ml 反應液 (50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.8; 0.1 mM EDTA; 0.06 mM cytochrome c; 0.05 mM xanthine; 10^{-8} M xanthine oxidase)。

2. CAT 酵素分析

總 CAT 活性的測定係根據 Beers 與 Sizer (1952) 的方法。使用的分析儀器為 “Waters” model: 2487 紫外光/可見光光譜吸收儀偵測器。分析方法是利用光譜吸收儀測定 H_2O_2 在波長 240nm 下減少的吸收數值。反應溶液包含 0.1 ml 植物粗酵素萃取液與 1.9 ml 反應液 (50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0; 5 mM H_2O_2)。

結 果

一、農桿菌菌液體積、乙酰丁香酮 (AS)及金鋼砂對共同轉殖 *rbcS*-TP-*sod62* 及 *rbcS*-TP-*cat78* 基因到'台農二號'小白菜效率之影響

為了提高農桿菌法的基因轉殖效率，本研究嘗試在培植體與農桿菌液共同培養 (co-cultivate) 時，進行以下的處理：(1) 使用90 μ l之農桿菌菌液；(2) 使用180 μ l之農桿菌菌液；(3) 在共同培養液中添加200 μ M乙酰丁香酮 (acetosyringone, AS)；(4) 在共同培養液中添加1g金鋼砂；(5) 在共同培養液中添加200 μ M 乙酰丁香酮 (acetosyringone, AS) 與1g金鋼砂。由表1的結果顯示，'台農二號'小白菜在五個處理中，以菌液使用180 μ l的處理後的培植體致死率最高，達93.3%，其次為添加乙酰丁香酮與金鋼砂之處理，致死率為43.3%，再其次為添加金鋼砂之處理，致死率為33.3%，單獨添加 乙酰丁香酮之處理，致死率為10%，而菌液使用90 μ l之處理的致死率最低，為6.7%。試驗結果顯示，使用90 μ l之農桿菌菌液或在共同培養液中添加200 μ M乙酰丁香酮，均可降低農桿菌感染時培植體致死率。

Kanamycin 抗性方面，由表 1 的結果顯示'台農二號'品種的五個處理中以添加金鋼砂之處理可獲得 6 株成活植株最高，其篩選成活率為 20%；添加 AS 之處理可獲得 5 株成活植株次之，其篩選成活率為 16.7%；添加 AS 與金鋼砂之處理篩選成活率為 13.3%，獲得 4 株成活植株；菌液使用 90 μ l 之處理獲得 2 株成活植株，篩選成活率為 6.7%；菌液使用 180 μ l 之處理未獲得成活植株，篩選成活率最低為 0%。試驗結果顯示，在共同培養液中添加 200 μ M 乙酰丁香酮或加入金鋼砂之處理，可提高感染之基因轉殖效率。

PCR及南方墨點分析結果顯示，以在共同培養液添加1g 金鋼砂的處理對提高農桿菌轉殖效率的效果最好，可測得*sod62*及*cat78*基因的存在；其次為添加200 μ M 乙酰丁香酮之處理。歸納上述調查項目的結果顯示，以農桿菌法進行小白菜基因轉殖，在農桿菌感染時，於共同培養液中加入金鋼砂或添加200 μ M乙酰丁香酮，可提高基因轉殖效率。

二、*rbcS*-TP-*sod* 與 *rbcS*-TP-*cat* 基因轉殖、轉殖植株之篩選與分析

將本實驗室構築之 *rbcS*-TP-*sod* (即pKrTScn, 12,300bp)與*rbcS*-TP-*cat* (即pKrTCcn, 13,300bp) (吳, 2002) (圖1)，依據Rogers等 (1987) 之方法，分別進行三親交配，長出之菌落即為三親交配之農桿菌，作為本試驗之農桿菌感染基因轉移使用。切取小白菜種子發芽第三天的子葉與下胚軸，置於含有5% MES之MS液態培養基中，分別添加70~90 μ l 三親交配後的pKrTScn農桿菌液與pKrTCcn農桿菌液共同培養48~72小時，再以含有500~1000 mg/L carbenicillin 之液體培養基浸泡以殺滅農桿菌後，將感染後的子葉或下胚軸培養於含有20 mg/L kanamycin 之選擇性分化再生培養基中(圖2A)，以篩選抗kanamycin之轉殖植株(圖2B)，每10天繼代培養一次，試管內培養約30天左右，經由健化移出瓶外(圖2C)，澆40mg/L kanamycin抗生素溶液以繼續進行第二次篩選(圖2D)。圖2E及圖2F為轉殖'小白菜抽苔、開花及結莢之情形。

表 1. 農桿菌菌液體積、乙酰丁香酮 (AS) 及金鋼砂對共同轉殖 *rbcS*-TP-*sod62* 及 *rbcS*-TP-*cat78* 基因到'台農二號'小白菜效率之影響

Table 1. Effects of volumes of *Agrobacterium*, acetosyringone (AS), and emery on the transformation efficiency of co-transferring *rbcS*-TP-*sod62* and *rbcS*-TP-*cat78* genes into Pak-choi 'Tainung No.2'.

感染 Infection	x 培植體 Explants		y 死亡苗株 Dead Plantlets		y 成活苗株 Survival Plantlets		PCR 分析 PCR Assay		南方分析 Southern Assay	
	數目 (No.)	百分比 (%)	數目 (No.)	百分比 (%)	數目 (No.)	百分比 (%)	<i>sod</i> (No.)	<i>cat</i> (No.)	<i>sod</i> (No.)	<i>cat</i> (No.)
<i>Agrobacterium</i> (90 μ l)	30	6.7	2	6.7	2	6.7	0	0	0	0
<i>Agrobacterium</i> (180 μ l)	30	93.3	28	93.3	0	0	0	0	0	0
AS (Acetosyringone)	30	10.0	3	10.0	5	16.7	1	1	1	1
金鋼砂 (Emery)	30	33.3	10	33.3	6	20.0	1	1	1	1
AS+ Emery	30	43.3	13	43.3	4	13.3	0	0	0	0

x : 子葉與下胚軸培植體之總數目。Total number of cotyledon and hypocotyl explants.

y : 再生苗株培養於含 20 mg/L kanamycin 之培養基後，成活之苗株數目。Regenerated plantlets were cultivated in the culture medium containing 20 mg/L of kanamycin.

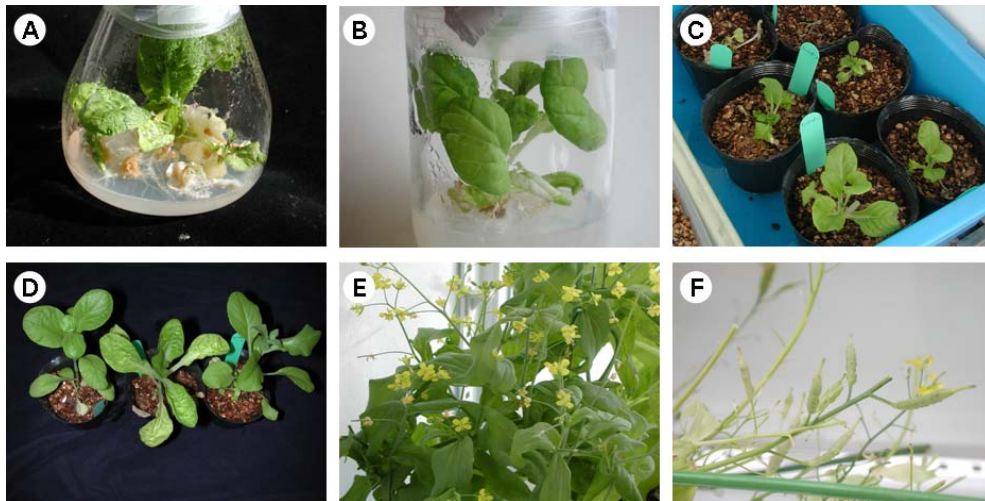


圖 2. 小白菜感染農桿菌 (LBA4404/pKrTScn/pKrTCcn) 後再生的情形。(A) 芽梢以 kanamycin 篩選 (20 mg/L)；(B) 抗 kanamycin 之再生瓶苗；(C) 移出瓶外，健化；(D) 噴灑 kanamycin (40 mg/L)，進行第二次篩選；(E) 抽苔、開花；(F) 結莢之情形。

Fig. 2. Regeneration of Pak-choi after *Agrobacterium* (LBA4404/pKrTScn/ pKrTCcn) infection. (A) Primary selection of regenerated plantlets using 20 mg/L of kanamycin; (B) Kanamycin resistant plantlet; (C) Transfer transformed plants to pots and hardening; (D) Secondary selection of transformed plants by spraying 40 mg/L of kanamycin; (E) Bolting and flowering of transformed plants; (F) Podding of transformed plants.

表2為'台農二號'小白菜經農桿菌法轉移*rbcS*-TP-*sod62*與*rbcS*-TP-*cat78*兩種基因之植株再生、抗生素篩選與轉殖效率之分析結果，顯示在1,272個培植體中，有224個培植體可分化再生出不定芽，植株再生率為17.6%。經過20 mg/L kanamycin 之選擇性培養基篩選後獲得29株成活植株(篩選成活率為13.0%)，然而經過後續的*sod*基因之PCR分析，僅有4株具有0.65 kb之*sod62*條帶 (圖3A)，此4株植株經過*cat*基因之PCR分析具有預期之0.9 kb之*cat78*片段條帶(圖3B)，根據以上之結果估計'台農二號'品種之農桿菌轉殖法的總轉殖效率為0.32%。

三、共同轉殖*rbcS*-TP-*sod62*及*rbcS*-TP-*cat78*基因之小白菜的後裔植株基因與酵素之分析

本研究將PCR分析、螢光法南方墨點雜交偵測分析呈正反應之轉殖小白菜植株(T_0)，於其抽苔開花時期進行蕾期自交授粉，收獲 T_0 代自交種子。每一株轉殖植物依據其採種數量，分別隨機選取50~150粒 T_0 代種子與未轉殖之'台農二號'種子(對照組)分別播種於含有20 mg/L kanamycin 之MS基本培養基 (Murashige and Skoog, 1962)。種子發芽後，調查種子

發芽數(kanamycin 抗性)，其結果如表3所示。將抗生素篩選試驗仍然成活並生長良好之後裔植株移植於MS基本培養基中，進行T₁後裔植株之PCR分析檢測。

PCR 分析結果成活之再生的小白菜T₁代植株，顯示農桿菌轉殖*sod*與*cat*基因轉殖植株之T₁後裔，在*sod*基因方面，大約有29%~37%T₁代植株仍具有0.65 kb之 *sod62*條帶(表3)；在*cat*基因方面，試驗結果顯示90%以上之 T₁代植株均具有0.9 kb 之*cat78*條帶 (表3)。RT-PCR分析檢測小白菜轉殖植株之T₁後裔之基因表現情形之試驗結果顯示，在*sod*基因方面，經由PCR分析檢測獲得具有0.65 kb *sod*條帶之41株T₁後裔，抽取其葉片的total RNA，並使用S-3與S-4進行RT-PCR之分析，僅有10株T₁後裔仍表現轉殖之結球白菜*sod62*基因(表3)。在*cat*基因方面，共有48株T₁後裔表現轉殖之結球白菜*cat78*基因 (表3)。

表4為經由農桿菌法轉殖帶有*rbcS-TP-sod*與*rbcS-TP-cat*至小白菜之轉殖植株的自交T₁代後裔，葉片的SOD及CAT酵素活性分析情形。由試驗的結果顯示，所獲得六個品系(T-2-1⊗, T-2-2⊗, T-2-6-1⊗, T-2-6-2⊗, T-6⊗, T-7⊗)之T₁代後裔的SOD活性均較未轉殖之'台農二號'對照組顯著增加，約為對照組之2.8~4.2倍。六個T₁代後裔的CAT活性均較未轉殖之對照組略為增加，後裔T-6⊗與T-7⊗之CAT酵素活性比對照組僅多出15~46%；後裔T-2-2⊗, T-2-6-1⊗, T-2-6-2⊗之CAT酵素活性約為對照組之2倍~2.2倍。

討 論

一、小白菜農桿菌基因轉殖系統之建立

1997年，Cai等人使用攜帶cowpea trypsin inhibitor 基因(CpTI)的Ti質體pRC27，藉由農桿菌LBA4404品系進行農桿菌基因轉殖，而成功獲得小白菜之轉殖植株。以上試驗在進行農桿菌基因轉殖後，使用500 mg/L carbenicillin 或 cefotaxime 以殺滅農桿菌後，持續培養於含有低濃度的 carbenicillin 或 cefotaxime 之培養基中以控制農桿菌的復發。Cai等同時指出在10 mg/L carbenicillin 之濃度情況下，小白菜再生之不定芽會有白化現象，然而在相同濃度之 cefotaxime 情況下，小白菜之白化現象減少 (Cai *et al.*, 1997)。本試驗中，亦使用低濃度的 carbenicillin (10 mg/L) 以控制農桿菌的復發，但並未發現再生之不定芽有白化現象，這可能是由於試驗品種不同之故，Cai等使用'矮腳黃'、'蘇州青'、'中腳黑葉'、'矮腳黑葉'等四個品種，而本試驗使用台灣本地育成之'台農二號'品種。

Lim等(2000)報導在結球白菜的農桿菌基因轉殖過程中添加10mg/L 乙酰丁香酮可增加轉殖成功之頻度。本試驗中針對提高農桿菌感染與轉殖效率，進行不同量的菌液、添加乙酰丁香酮(AS)與添加金鋼砂的五種處理，比較評估對於農桿菌感染與轉殖效率的成效。結果顯示，在共同培養(co-cultivation)的過程中添加1g 金鋼砂，可使篩選成活率提高13.33%，使抗生素篩選率提高5%；而在共同培養的過程中添加200 μM 乙酰丁香酮可使篩選成活率提高6.67%~10%，使抗生素篩選率提高3.7%。至於提高菌液量會使共同培

表 2. 以農桿菌法共同轉殖 *rbcsS-TP-sod62* 及 *rbcsS-TP-cat78* 基因之‘台農二號’小白菜再生植株之 kanamycin 抗性、PCR 與南方墨點分析的結果。

Table 2. Kanamycin resistance, PCR and Southern blotting hybridization in *rbcsS-TP-sod62* and *rbcsS-TP-cat78* genes co-transformed Pak-choi 'Tainung No.2' via *Agrobacterium*-mediated transformation.

試驗 Experiments	培植體 ^x Explants		再生苗株 Regenerated Plantlets		成活苗株 ^y Survival Plantlets		PCR 分析 PCR Assay		南方分析 Southern Assay	
	數目 (No.)	數目 (No.)	百分率 (%)	百分率 (%)	數目 (No.)	百分率 (%)	<i>sod</i> (No.)	<i>cat</i> (No.)	<i>sod</i> (No.)	<i>cat</i> (No.)
1st	282	7	2.6	2.6	1	14.3	0	0	0	0
2nd	178	18	12.9	12.9	3	16.7	0	0	0	0
3rd	812	199	32.2	32.2	25	12.6	4	4	4	4
Total	1272	224	17.6	17.6	29	13.0	4	4	4	4

^x: 子葉與下胚軸培植體之總數目。Total number of cotyledon and hypocotyl explants.

^y: 再生苗株培養於含 20 mg/L kanamycin 之培養基後，成活之苗株數目。Regenerated plantlets were cultivated in the culture medium containing 20 mg/L of kanamycin.

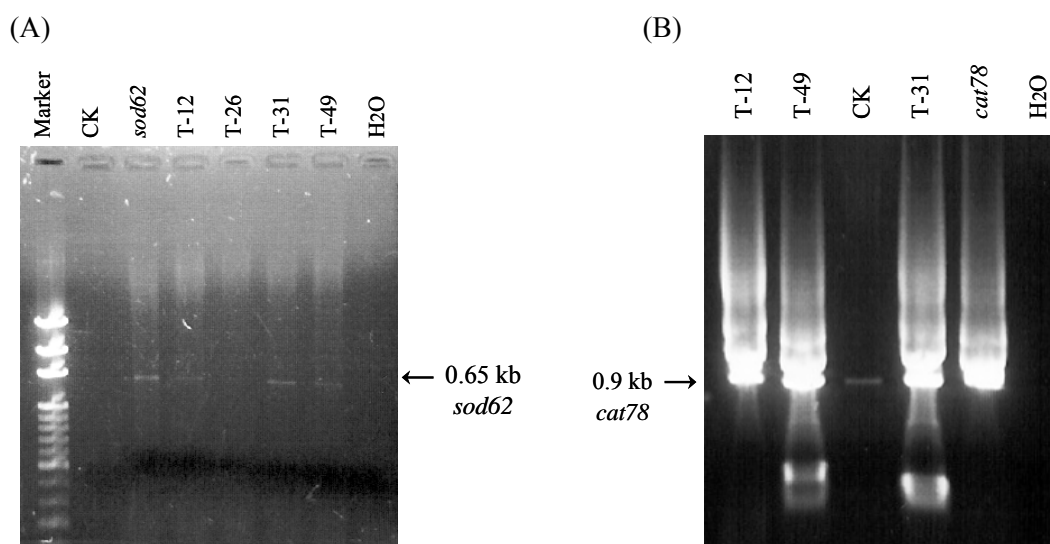


圖 3. 以農桿菌法共同轉殖 *rbcS*-TP-*sod62* 及 *rbcS*-TP-*cat78* 基因之再生'台農二號'小白菜葉片之 DNA，經 PCR 反應，分析 *sod62* (A) 及 *cat78* (B) 基因的情形。CK：未轉殖小白菜。

Fig. 3. PCR analysis of *sod62* and *cat78* genes in leaf DNA of the *rbcS*-TP-*sod62* and *rbcS*-TP-*cat78* genes co-transformed Pak-choi 'Tainung No.2' via *Agrobacterium*-mediated transformation. The part of *sod62* (0.65 kb) (A) and *cat78* (B) genes were amplified from a plasmid or DNA from leaves and analyzed by electrophoresis. CK: non-transformed Pak-choi.

養的培植體之致死率提高，不宜使用之。乙酰丁香酮可提高農桿菌感染與轉殖效率的事實是眾所周知的，而於共同培養的過程中添加金鋼砂做為創傷處理，可增加培植體的傷口，將有利於農桿菌的感染(Grierson and Covey, 1988)；並因可能對生長點有所創傷，破壞其頂芽優勢，對於生長勢較強的中胚軸培養可促成側芽增生。Cheng 等 (1996)也指出用金鋼砂處理木瓜體胚進行創傷處理，是有助於轉殖效率的提高。金鋼砂可以提高轉殖效率在本試驗中獲得證實，其效果甚高於添加乙酰丁香酮，其主要原因為在共同培養的搖盪過程中，金鋼砂的粗糙表面可磨擦培植體，增加植物組織表面傷口的數目，而達到提高農桿菌感染與轉殖效率。

本試驗所使用之轉殖載體皆攜帶 *NPTII* 抗生素的篩選基因，經由此基因的表現所產生的蛋白質，可使非轉殖組織之生長受到抑制，故可作為再生植株初期生長篩檢之用 (Guerineau, 1995)。Kanamycin 是一種有效率的篩選基因所使用之抗生素 (Rogers *et al.*, 1987)，對植物細胞而言，kanamycin 會使粒線體和葉綠體的蛋白質合成受阻，而導致葉片

表 3. 共同轉殖 *rbcS*-TP-*sod62* 及 *rbcS*-TP-*cat78* 基因之小白菜後裔植株之 kanamycin 抗性、PCR 與 RT-PCR 分析之結果。

Table 3. Kanamycin resistance, and the assay of PCR and RT-PCR in the progenies of *rbcS*-TP-*sod62* and *rbcS*-TP-*cat78* genes co-transformed Pak-choi.

品系 Line	T0 種子數目 T0 Seed No.	T1 成活苗 ^x Survival Plants		PCR 分析 PCR Assay		RT-PCR 分析 RT-PCR Assay	
	數目 (No.)	數目 (No.)	百分率 (%)	<i>sod</i> (No.)	<i>cat</i> (No.)	<i>sod</i> (No.)	<i>cat</i> (No.)
T-2-1 ⊗	58	11	19.0	4	11	1	5
T-2-2 ⊗	150	26	17.3	9	26	2	11
T-2-6-1 ⊗	105	26	24.8	8	26	2	8
T-2-6-2 ⊗	120	12	10.0	4	12	1	4
T-6 ⊗	150	30	20.0	11	30	3	14
T-7 ⊗	100	17	17.0	5	17	1	6
CK (No.2)	80	0	0	—	—	—	—

^x 種子培養於含 20 mg/L kanamycin 之培養基，成活發芽之苗株數目。Seeds were cultivated in the culture medium containing 20 mg/L of kanamycin.

出現白化之現象(Weide *et al.*, 1989)。Kanamycin 使用於篩選轉殖植株所使用之濃度為 100~300 mg/L (Horsch *et al.*, 1985)，雖然有許多植物對 kanamycin 有很強的抗性，但蕓苔屬植物對 kanamycin 屬於較敏感性，一般對蕓苔屬蔬菜所推薦的使用濃度為 20~70 mg/L (何, 1993；尤, 1994)，Cai 等人(1997)之試驗中指出 20 mg/L kanamycin 會抑制小白菜子葉再生之不定芽的發育，是故 10 mg/L kanamycin 最適合用以篩選小白菜之轉殖體。使用含有 0-1 mg/L kanamycin 之 selection medium 作篩選，成活之植株移出試管後使用 10 mg/L kanamycin 可成功篩選出轉殖體。本試驗所使用之 kanamycin 濃度為 20 mg/L，將感染後的子葉或下胚軸培養於含有 20 mg/L kanamycin 之選擇性分化再生培養基中，以篩選轉殖植株。

二、*sod* 與 *cat* 基因轉殖、轉殖植株之篩選與分析

本研究使用的轉殖載體以 *rbcS* 當啟動子，並攜帶有 transit peptide 與結球白菜之 *sod62* 及 *cat78* 的目標基因，即 pKrTScn 與 pKrTCcn 的重組載體(吳, 2002)。以 *rbcS* 啟動子當

表 4. 共同轉殖 *rbcS*-TP-*sod62* 及 *rbcS*-TP-*cat78* 基因之小白菜後裔植株的超氧化物歧化酵素(superoxide dismutase, SOD) 及 過氧化氫酵素 (catalase, CAT) 活性。

Table 4. The activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in the progenies of *rbcS*-TP-*sod62* and *rbcS*-TP-*cat78* genes co-transformed Pak-choi.

品系 Line	SOD activity (Unit / mg protein) ^w	CAT activity (Unit / mg protein) ^x
T-2-1 ⊗	0.32 ±0.13 ^y	20.8 ±0.5
T-2-2 ⊗	0.33 ±0.08	26.2 ±1.4
T-2-6-1 ⊗	0.42 ±0.07	29.0 ±0.3
T-2-6-2 ⊗	0.39 ±0.15	28.6 ±2.6
T-6 ⊗	0.30±0.12	19.2 ±0.8
T-7 ⊗	0.28 ±0.13	15.1 ±1.3
CK (No.2)	0.11 ±0.12	13.3 ±1.2

^w 一單位(unit)的 SOD 活性定義為抑制 50% cytochrome c 還原，所須要酵素的量。One unit is defined as the quantity of enzyme required to inhibit the reduction of cytochrome c by 50%.

^x 一單位(unit)的 CAT 活性定義為在每分鐘內 A240 的變化× 1000/ 43.6 × mg 酵素/ml。One unit is defined as ρA_{240} per min × 1000 per 43.6 × mg enzyme per ml reaction.

^y 數據為五次分別的測定之平均值。Means were obtained from 5 independent measurements.

作轉殖載體，在尤之研究(2000)顯示，以 *rbcS* 啟動子之 *E. coli* 的 *sod* 或 *cat* 基因在轉殖結球白菜與青花菜之再生植株，不論在北方墨點雜交分析、酵素活性分析與表現以及轉殖植株在 SO₂ 耐逆境程度分析，皆優於以 CaMV35S 啟動子者。Wegener 等(1994)將 *rbcS* 啟動子攜帶 *NPTII* 基因轉殖進入菸草，發現以 *rbcS* 啟動子之 *NPTII* 基因的表現量較以 CaMV35S 當啟動子者高出 10 倍。因此 *rbcS* 啟動子應是植物組織中能大量表現之啟動子。

本研究以農桿菌法進行 *rbcS*-TP-*sod* 與 *rbcS*-TP-*cat* 基因轉殖到'台農二號'小白菜。本試驗之受體培植體共 1,272 個，經由篩選培養基 30 天進行初步篩選，共獲得 29 株抗 kanamycin 之成活植株，以上植株經過進一步之 *sod* 與 *cat* 基因之 PCR 分析，4 株可同時偵測到具有預期之 0.65 kb 之 *sod62* 片段條帶及預期之 0.9 kb 之 *cat78* 片段條帶。根據以上之結果，估計以農桿菌法共同轉殖 *rbcS*-TP-*sod* 與 *rbcS*-TP-*cat* 兩個基因到小白菜的總轉殖效率為 0.32%。

本試驗將感染後的子葉或下胚軸培養於含有20 mg/L kanamycin之選擇性分化再生培養基中，以篩選轉殖植株，每10天繼代培養一次，待分化再生出不定芽後一週，再移至含有20mg/L kanamycin之1/2MS (Murashige and Skoog, 1962) 培養基使其繼續發育成長。試管內培養約30天左右，經由健化移出瓶外，每天澆40mg/L kanamycin抗生素溶液以繼續進行篩選。本研究進行強kanamycin 抗性的篩選轉殖植株，雖然可較嚴格篩選到轉殖植株，但也可能影響轉殖植株的分化再生及殺死已轉殖*sod62*或/且*cat78*基因的轉殖小白菜。

轉殖基因植株之 T₁ 後裔常會發生目標基因不活化的情形 (Hart *et al.*, 1992), 本試驗以 PCR 與 RT-PCR 分析檢測轉殖小白菜植株 T₁ 代後裔植株之表現，進一步探討轉殖基因是否穩定遺傳。PCR 分析農桿菌轉殖成功小白菜 T₁ 代之結果顯示，在 *sod* 基因方面，T₁ 代後裔有 1/3 植株具有 0.65 kb *sod* 之條帶，表示轉殖之 *sod62* 基因嵌插進入轉殖植物為異質型的單一基因座；在 *cat* 基因方面，90%以上的 T₁ 代植株均具有 0.9 kb *cat* 條帶，這可能係因小白菜植物本身內生的 *cat* 基因的表現干擾分析的結果。RT-PCR 分析小白菜轉殖 T₁ 後裔之基因表現情形，發現僅有 10 株 T₁ 後裔仍表現轉殖之結球白菜 *sod62* 基因；在 *cat* 基因方面，共有 48 株 T₁ 後裔表現轉殖之結球白菜 *cat78* 基因。此種存在轉殖 DNA 不表現 RNA 的情形，是否因為原本存在 *sod* 及 *cat* 基因造成基因沉默 (gene silencing)，有待進一步的深入探討。

基因轉殖嵌入植物染色體上並非十分穩定，常會有遺失的現象(Yang, 1988)，從本試驗的初步結果顯示，轉殖之 *sod62* 及 *cat78* 基因在 T₁ 代的遺傳在不同轉殖系之間並無一規律可循，可能尚迨後裔遺傳穩定後，觀察大量族群之基因遺傳行為，才能進一步瞭解其轉殖基因之遺傳模式及是否穩定的遺傳。分析轉殖小白菜 T₁ 後裔之抗氧化酵素活性，顯示小白菜之轉殖成功植株之自交 T₁ 代後裔的葉片 SOD 酵素活性，均較未轉殖之'台農二號'對照組顯著增加，約為對照組之 2.8~4.2 倍，而且 T₁ 代後裔的 CAT 活性也較未轉殖之對照組為增加，約為對照組之 1.2~2.2 倍。顯示農桿菌轉殖 *rbcS-TP-sod* 與 *rbcS-TP-cat* 基因，可提高轉殖植株與其後裔植株之抗氧化酵素活性。

大多數的葉綠體蛋白質是在細胞質中被合成，再被運送至葉綠體中，而這些蛋白質能否正確地運送至葉綠體，是決定葉綠體可否正常運作的關鍵(Chen and Schnell, 1999; 吳, 2002)。通常轉運進入葉綠體中的蛋白質，在其轉運的過程中需要 ATP 及蛋白之 N 端需添加一段導引訊息，此導引訊息又稱為 transit sequence 或 signal peptide。本試驗將 *sod62* 及 *cat78* 的目標基因，即 pKrTScn 與 pKrTCcn 的重組載體轉殖至同一小白菜植株，且於啟動子與目標基因之間，插入大豆葉綠體的 transit peptide，使目標基因所轉譯出來的蛋白質能過量且正確運往葉綠體內。由於本研究因為轉殖材料數量受限，無法大量分離葉綠體，進行葉綠體 SOD 及 CAT 酵素活性之檢測，因此轉殖基因表現的 SOD 及 CAT 酵素轉運進入葉綠體的量及其在葉綠體內的作用的資訊也受限。再者，轉殖 *sod62* 及 *cat78* 的小白菜植株沒有進行逆境處理，迨繁殖大量基因表現穩定之轉殖小白菜後裔，再進行不同逆境處理，或許更能揭露轉移基因所扮演的角色，俾能培育出耐逆境的小白菜品系。

參 考 文 獻

- 尤進欽。2000。超氧化歧化酵素與過氧化氫酵素基因之轉殖與選殖。國立中興大學園藝學系博士論文。260 頁。
- 尤進欽、曾夢蛟。2006。結球白菜之銅/鋅超氧化歧化酶(Cu/Zn superoxide dismutase, SOD) 基因與過氧化氫酶(Catalase, CAT)基因的選殖與分析。興大園藝 31(2): 55-73。
- 吳佳春。2002。結球白菜的超氧化歧化酵素與過氧化氫酵素基因轉移至甘藍及結球白菜之研究。國立中興大學園藝學系碩士論文。125 頁。
- 林照能、陳甘澍、劉政道。2004。小白菜新品種'臺農三號'簡介。農業世界 250:34-35。
- 林榮芳。1995。縐葉菸草異源染色體添加系的建立與鑑定 國立臺灣大學植物學研究所博士論文。94 頁。
- Alscher, R. G., J. L. Donahue and C. L. Cramer. 1997. Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. *Physiol. Plant.* 100:224-233.
- Beers, R. F. Jr. and I. W. Sizer. 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *195: 133-140.*
- Cai, X. N., J. M. She, Z. Zhu, W. M. Zhu, X. H. Yuan and X. J. Su. 1997. Establishment of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation system of common Chinese cabbage (*Brassica chinensis*). *Jiangsu Journal of Agricultural Science* 13(2):110-114.
- Casano, L. M., M. Martin and B. Sabater. 1994. Sensitivity of superoxide dismutase transcript level and activities to oxidative stress is lower in mature-senescent than in young barley leaves. *Plant Physiol.* 106:1033-1039.
- Chen, X. and D. J. Schnell. 1999. Protein import into chloroplasts. *Trend in Cell Biol.* 9:222-227.
- Cheng, Y. H., J. S. Yang, and, S. D. Yeh. 1996. Efficient transformation of papaya by coat protein gene of *Papaya ringspot virus* mediated by *Agrobacterium* following liquid-phase wounding of embryogenic tissues with carborundum. *Plant Cell Rep.* 16: 127-132.
- Grierson, D. and S. N. Covey. 1988. Genetic transformation of plants by *Agrobacterium*. In: *Plant Molecular Biology*. 2nd ed. Chapman and Hall, New York. p 141-157.
- Guerineau, F. 1995. Tools for expressing foreign genes in plants. *Methods Mol. Biol.* 49: 1-32.
- Hart, C. M., B. Fischer, J. M. Neuhaus, and F. Meins. 1992. Regulated inactivation of homologous gene expression in transgenic *Nicotiana sylvestris* plants containing a defense-related tobacco chitinase gene. *Mol. Gen. Genet.* 235: 179-188.
- Horsch, R. B., J. E. Fry, N. L. Hoffmann, D. Eichholtz, S. G. Rogers and R. T. Fraley. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 277: 1229-1231.

- Lim, H-T., H-J. Lee, E-J. Park and Y. N. Song. 2000. Factors influencing on the high efficient plant regeneration and genetic transformation in *Brassica* vegetable crops. 3rd ISHS International Symposium on Brassicas – 12th Crucifer Genetics Workshop (help at Horticulture Research International) , Wellesbourne, cv 35 9EF, UK. 5th-9th, Sep., 2000.
- Matters, G. L. and J. G. Scandalios. 1986. Effect of the free radical-generating herbicide paraquat on the expression of the superoxide dismutase (SOD) genes in maize. *Biochem. Biophys. Acta* 882:29-38.
- Matters, G. L. and J. G. Scandalios. 1987. Synthesis of isozymes of superoxide dismutase in maize leaves in response to O₃, SO₂ and elevated O₂. *J. Exp. Bot.* 38:842-852.
- McCord, J. M. and I. Fridovich. 1969. Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyperin (hemocuperin). *J. Biol. Chem.* 244:6049-6055.
- Murashige T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Panaud, O., G. Magpantay, and S. McCouch. 1993. A Protocol for nonradioactive DNA labelling and detection in the RFLP analysis of rice and tomato using single-copy probes. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11:54-59.
- Perl-Treves, R. and E. Galun. 1991. The tomato Cu, Zn superoxide dismutase genes are developmentally regulated and respond to light and stress. *Plant Mol. Biol.* 17:745-760.
- Rogers, S. G., H. J. Klee, , R. B. Horsch, and R.T. Fraley. 1987. Improved vectors for plant transformation: expression cassette vectors and new selectable markers. *Methods in Enzymology.* 153: 253-292.
- Saiki, R.K. 1989. The design and optimization of the PCR. In: *PCR Technolgy.* Erlich, H.A.M.(ed), Stockton Press. pp.7-16.
- Scandalios, J. G. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol.* 101; 7-12.
- Wegener, D., P. Steinecke, T. Herget, I. Petereit, C. Philipp and P. H. Schreier. 1994. Expression of a reporter gene is reduced by a ribozyme in transgenic plants. *Mol. Gene. Gen.* 245: 465-470.
- Weide, R., M. Koornneef and P. Zabel. 1989. A simple, nondestructive spraying assay for the detection of an active kanamycin resistance gene in transgenic tomato plants. *Theor. Appl. Genet.* 78: 169-172.
- Yang, N. S. 1988. Genotypic and phenotypic changes in new plant varieties. *Trends Biotechnol.* 6: 21-22.

Studies on Transformation of Superoxide Dismutase (*sod*) and Catalase (*cat*) genes into Pak-choi (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* L. Makino) via *Agrobacterium*-mediated Transformation

Jia-Yan Hsu¹⁾ You-Ming Chang²⁾ Menq-Jiau Tseng³⁾

Key words: Pak-choi, Superoxide dismutase, Catalase, *Agrobacterium*-mediated transformation

Summary

Superoxide dismutase and catalase play an important role in antioxidative stresses of plants. Attempts had been made to co-transfer the superoxide dismutase (*sod62*), and catalase (*cat78*) genes of Chinese cabbage into the 'Tainung No.2' Pak-choi. The objectives of this study were to establish the *Agrobacterium* transformation system of Pak-choi and to study the possibility for improvement of Pak-choi with stresses resistance by gene transformation.

Increases in the transformation efficiency were obtained in the co-culture medium supplemented with the emery or 200 μ M acetosyringone (AS). Cotyledon and hypocotyl explants of Pak-choi were co-infected with two *Agrobacterium* carrying a distinct disarmed T-DNA containing *rbcS-TP-sod62* (pKrTScn) and *rbcS-TP-cat78* (pKrTCcn) genes, respectively. The results of PCR and Southern bolt hybridization indicated that the *rbcS-TPsod62* and *rbcS-TPcat78* genes had been transferred into Pak-choi, and inserted into their genomes. T₀ seeds were germinated on MS medium containing 20 mg/L of kanamycin for two weeks. Survival T₁ seedlings were subjected to PCR and Southern bolt hybridization analysis. The results of genetic analysis indicated that the transformed *rbcS-TP-sod62* and *rbcS-TP-cat78* genes had been stably inherited in T₁ progeny plants. Significant higher SOD and CAT activities were detected in the T₁ transgenic progeny of Pak-choi than those of control plants.

1) Graduate student in Ph.D. Program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University..

2) Associate Professor, Department of Biotechnology, TransWorld University.

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

