

聖誕紅色素基因轉殖之研究

李翠鳳¹⁾ 王強生²⁾ 朱建鏞³⁾

關鍵字: 聖誕紅、體胚再生、農桿菌、大豆種皮

摘要：以聖誕紅‘Nobel Star’和‘Peter Star-White’為材料，經由體胚再生方法以農桿菌EHA105進行大豆種皮色素基因flavonoid 3-hydroxylase (F3H)、flavonoid 3’,5’-hydroxylase (F3’,5’H)以及anthocyanidin synthase gene (ANS) 的基因轉殖。從‘Nobel Star’和‘Peter Star-White’的篩選抗生素濃度測試結果，5 mg/l hygromycin有13%的存活率，而在含10 mg/l hygromycin則無存活的培植體。抑制農桿菌的抗生素以timentin對莖段培植體的毒害最低，癒傷組織形成的比率較高並可繼續增殖。利用莖段為培植體以農桿菌進行基因轉殖，芽體篩選再生率為20.7%，再生篩選時間約24週。‘Nobel Star’轉殖株以PCR檢測後，轉殖F3H和ANS基因各獲得5和7株轉殖株，其轉殖效率分別為1.3%和2.3%。‘Peter Star-White’轉殖株以PCR檢測後，轉殖F3H和F3’,5’H基因各獲得19和23株轉殖株，轉殖效率分別為6.3%和7.7%。

前 言

聖誕紅(*Euphorbia pulcherrima* Wilid.et Kltz)，屬於大戟科大戟屬，原產中美洲墨西哥。聖誕紅的種原庫極小(Stewart et al., 1979)，欲以傳統育種方法來改良植株性狀很困難，加上有性繁殖能力極低，要在遺傳變異上有所突破，除了傳統之實生育種或誘變育種外，仍需仰賴遺傳工程之進行(朱和趙，2002)。目前聖誕紅基因轉殖的研究甚少，僅知 Clarke 等人(2008)以聖誕紅莖段進行農桿菌基因轉殖，利用 RNAi 構築轉入 poinsettia mosaic virus (*PnMV*)基因至聖誕紅‘Millenium’中，其轉殖效率平均達 2.1%。有關聖誕紅色素基因轉殖的研究僅 Vik(2003)有涉及，係轉殖矮牽牛 F3’,5’H 基因，期望產生紫色或藍色的聖誕紅品種，以南方雜交分析證明有 1 個拷貝的 F3’,5’H 基因嵌入轉殖株，並發現轉殖株的苞片產生藍點。上述聖誕紅農桿菌基因轉殖方法，大多以莖頂作為培植體來源，但其轉殖效率仍低(Vik et al., 2001)。本研究以莖段培植體誘導體胚再生，建立高效率之農桿菌基因轉殖系

-
- 1)國立中興大學園藝學系碩士班研究生。
 - 2)國立中興大學農藝學系副教授。
 - 2)國立中興大學園藝學系教授，通訊作者。

統，期能培育出新穎顏色之聖誕紅品種。

材料與方法

一、植物材料

試驗品種為聖誕紅橙紅色的‘諾貝爾之星’(‘Nobel Star’)和白色的‘彼得之星-白’(‘Peter Star-White’)。植株栽培於中興大學園藝系網室，依盆花栽培管理方法管理。

二、培植體及培養環境

取供試品種約 3cm 長的頂梢，去除葉片後，以 1% NaOCl 溶液消毒 10 分鐘，再以無菌水沖洗 3 次，切取大約 0.5-1 mm 的莖頂，約 2 個月後莖頂在瓶內發育成植株，建立無菌瓶苗(趙和朱，2000)，作為農桿菌基因轉殖之材料。培養室溫度為 25 °C±3 °C，並以冷白日光燈(旭光牌 FL 40D/38，台灣日光燈公司)提供光合作用光子流密度(Photosynthetic Photon Flux Density, PPFD)為 35±5 μmol s⁻¹ m⁻² 的光照。除暗培養外，所有培養之光週期為明期 16 小時，暗期 8 小時。

三、基因轉殖培養基

試驗之基本培養基含 MS 商業配方(Murashige and Skoog Basal Medium, Sigma Chemical Co., Mo, U.S.A.) 4.4 g/l, 30 g/l 蔗糖(台糖細粒特砂)以及 6 g/l 的洋菜粉(Difco Bacto agar)。癒傷組織誘導培養基為基本培養基添加 0.2 mg/l 6-benzylaminopurine (BA)和 0.4 mg/l p-chlorophenoxyacetic acid(CPA)。芽體及體胚發育培養基為基本培養基添加 1 mg/l BA 和 10 mg/l 核黃素(riboflavin)。體胚成熟培養基為基本培養基添加 0.2 mg/l kinetin 和 10 mg/l 核黃素，可促進胚軸伸長與發根(朱和馮，2003)。滅菌前將培養基調整為 pH 值至 5.7±0.1，經 121 °C 高壓滅菌釜滅菌 15 分鐘。培養基經滅菌後當溫度降至 60 °C 時，以過濾除菌方法，加入殺菌抗生素 500 mg/l cefotaxime (cefotaxime sodium, Duchefa Biochemie B. V., The Netherlands)與不同濃度(mg/l)之篩選抗生素 hygromycin (hygromycin B, Merck KgaA, Darmstadt, Germany)，混合均勻後分裝至 9 cm 培養皿中，供基因轉殖培植體再生使用。

四、農桿菌基因轉殖載體

試驗使用農桿菌(*Agrobacterium tumefaciens*)EHA105 菌系和選殖自大豆種皮(*Glycine max* ‘CRWD’)之花青素生合成構造基因，分別為 F3H (flavanone 3 -hydroxylase, ACC No.AF198451) 基因(邱，1998)構築於 pCAMBIA1302 轉殖載體，F3’,5’H (flavonoid 3’,5’-hydroxylase, ACC No.AY117551)基因(Liao，2005)和 ANS(anthocyanidin synthase, ACC No.AY382828)(黃，2002)基因構築於 pCAMBIA1300 載體中。轉殖載體均含有 *hpt* 基因(抗 hygromycin)作為抗生素篩選標誌，並以 CaMV(cauliflower mosaic virus)35S 為啟動子啟動基因。

五、轉殖農桿菌之製備

以無菌接種環，從含有 100 mg/l kanamycin 之 LB 固體培養基(5 g/l yeast extract, 10 g/l

NaCl, 1 g/l tryptone)挑取農桿菌單一菌落，培養在含有 50 mg/l kanamycin 之 LB 液體培養基中，在 28 °C、200 rpm 震盪培養箱中暗培養，直到菌液吸光值 OD₆₀₀ 約為 0.3-0.4 之間，加入 100 μM 乙醯丁香酮(acetosyngone, Aldrich Chem.)溶液，繼續在 28 °C、200 rpm 震盪培養箱中暗培養，直到菌液的吸光值 OD₆₀₀ 約為 0.6-0.8 之間，以 4,000 rpm 離心 10 分鐘，倒除上清液後，加入含 200 μM 乙醯丁香酮的 MS 液體培養基懸浮菌體以感染聖誕紅殖體。

六、試驗方法

(一) 抗生素 hygromycin 對聖誕紅抗性濃度之測試

切取‘Nobel Star’和‘Peter Star-White’瓶內植株之莖段約 0.5 cm 作為培植體，培養在含有 1 mg/l、3 mg/l、5 mg/l 或 10 mg/l 之 hygromycin 的癒傷組織誘導培養基中進行測試。評估篩選抗生素 hygromycin 對未轉殖培植體之致死濃度，以建立抗生素篩選系統。每一處理共 20 個培植體，試驗進行三重複。經 4 週後記錄莖段培植體的存活率。

(二) 抗生素對聖誕紅癒傷組織形成之影響

取聖誕紅‘Nobel Star’和‘Peter Star-White’之莖段約 0.5 cm 為培植體，培養在含有 500 mg/l cefotaxime、500 mg/l carbenicillin 和 500 mg/l timentin 的癒傷組織誘導培養基中。每一處理共 50 個培植體，試驗進行三重複。經 4 週後記錄在含不同抗生素的培養基中，莖段培植體癒傷組織生長情形。

(三) 聖誕紅莖段培植體之基因轉殖

使用聖誕紅‘Nobel Star’和‘Peter Star-White’約 2 個月大之無菌苗，切取自瓶內植株莖頂下之莖段約 0.5 cm，置於 MS 基本培養基中，進行農桿菌基因轉殖，分別將構築有 F3H、F3',5'H、ANS 基因構築之農桿菌菌液與培植體感染 30 分鐘後，培植體移至癒傷組織誘導培養基中，於 25 °C 下暗培養 2 天後，再培養於含有 5 mg/l hygromycin 之癒傷組織誘導培養基中，以篩選轉殖細胞，每隔 3 週行繼代培養，誘導體胚分化。再移植至含有 5 mg/l hygromycin 之體胚分化培養基。每次培養共 100 個培植體，試驗進行三次。再生之抗性轉殖株經由篩選與 PCR 分析後，調查基因轉殖效率。

七、聖誕紅轉殖株小量 DNA 之萃取

萃取經 hygromycin 篩選再生後之無菌苗葉片的 DNA，參照 Doyle 和 Doyle (1987) 的方法，以萃取法進行小量 DNA 之抽取與純化。取聖誕紅轉殖株之葉片大約 50-100 mg，放入含玻璃珠之 2.0 ml 離心管中，以液態氮冷凍後，再以粉碎機(Roche, Germany)震盪破碎。加入 600 μl 預熱之萃取緩衝液含 [2% cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB), 2% w/v PVP40, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl 和 0.2% v/v 2-mercaptoethanol] 以及 10 μl RNaseA (10 mg/ml) 進行 DNA 萃取。將樣品均勻混合，放置 65 °C 水浴 10 分鐘，期間要溫和的搖動。加入等體積 600 μl PCI 溶液 (phenol:chloroform:isoamyl-alcohol = 25/24/1)，混合均勻後，以 13,000 rpm、離心 10 分鐘；取上清液至 1.5 ml 離心管。加入 2 倍體積之 100% 酒精，混合均勻，放置 -20 °C 沉澱 30 分鐘。以 13,000 rpm，離心 20 分鐘後，倒

除上清液，留下沉澱物；以250 µl 70%酒精清洗管壁，倒除酒精後，將DNA乾燥，再加入適量的無菌水溶解DNA，取純化後的DNA供PCR分析之用。DNA溶液短期內使用可暫時儲存於4 °C中，長期保存則應置於-20 °C下。

八、轉殖株之聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)分析

取500 ng之DNA為模板，進行PCR檢測分析。加入1.0 µl正向及反向引子(10 µM)及2.5 µl 10x PCR buffer(Invitrogen, USA)，2 µl dNTP(2.5 mM, TaKaRa BioMedicals, Tokyo)，和1.0 unit DNA 聚合酶(Invitrogen, USA)，反應總體積為25 µl。將離心管置於聚合酶連鎖反應器(BioRad, USA)，先以95 °C 2分鐘活化酵素及將DNA模板變性，進行PCR 32 循環：95 °C 30秒，60 °C 1分鐘，72 °C 3分鐘，最後於72 °C加長作用5分鐘。反應產物取 10 µl，並以1% 洋菜膠體(SeaKem LE Agarose；BMA, BioWhittaker Molecular Application)電泳分離，在100伏特電壓下，進行產物大小分析。

PCR 所使用primer的序列大小如下：

Primer name	Primer Sequence (5'→3')	Size(bp)
ANS1-F	GGCCCAAGAAACCCGATGAT	401 bp
ANS1-R	CAAACCCCGATGAAGAATGCTC	
F3H-F	AGCATTGCATTCTGCTATTTAATTC	674 bp
F3H-R	GGTAGTAATTAACCACCACCTTC T	
F3'5'H-F	GGACTTGCAAGGCATAGAGC	410 bp
F3'5'H-R	TCGAGGCAGGTTTAGGGGT	

八、統計分析

數據之處理使用 CoStat 6.1 統計軟體(CoHort software, Minneapolis, USA)進行統計分析，先以單向變方分析(One-way ANOVA)比較各組間之差異，再以最小顯著差異性測驗法(Fisher's least significant difference method, 簡稱 LSD)做各組間顯著差異性之比較，統計之顯著性以 $p \leq 0.05$ 為標準。

結 果

一、抗生素 hygromycin 對聖誕紅抗性濃度之測試

聖誕紅 'Nobel Start' 莖段培植體在含 1 mg/l hygromycin 有 68%的存活率，3 mg/l hygromycin 有 45%的存活率，5 mg/l hygromycin 有 13%的存活率，而在含 10 mg/l hygromycin 則無存活的培植體。此外，'Peter Star-White' 莖段培植體在含 1 mg/l hygromycin 有 77%的存活率，3 mg/l hygromycin 有 48%的存活率，5 mg/l hygromycin 有 27%的存活率，同樣在 10 mg/l hygromycin 皆無存活的培植體(表 1)。

表 1. 聖誕紅莖段培植體在 hygromycin 培養基之存活率(%)

Table 1. Survival rate (%) of poinsettia stem explants culture on hygromycin media.

Hygromycin (mg/l)	Survival rate (%) ^z	
	‘Nobel Star’	‘Peter Star-White’
0	100.0 a ^y	100.0 a
1	68.3 b	76.7 b
3	45.0 c	48.3 c
5	13.3 d	26.7 d
10	0 e	0 e

^z 培養 4 週後調查。

^y 同行字母相同者表示經 LSD 分析結果無顯著差異。

^z Investigations were conducted at 4 weeks of culture.

^y Means with the same letter in a column are not significantly different by LSD test at $p \leq 0.05$ level.

二、抗生素對聖誕紅癒傷組織形成之影響

聖誕紅‘Nobel Star’和‘Peter Star-White’莖段培植體經4週培養後，‘Nobel Star’在含500 mg/l cefotaxime 之培養基中褐化率為73%；在含500 mg/l carbenicillin褐化率為82%；而在500 mg/l timentin中褐化率為50%；以carbenicillin對‘Nobel Star’莖段的傷害最為嚴重；而timentin對癒傷組織形成的比率最高(表2)。「Peter Star-White」在含500 mg/l cefotaxime 之培養基中褐化率為86%；在含500 mg/l carbenicillin褐化率為75%；而在500 mg/l timentin中褐化率為72%；三者均對‘Peter Star-White’莖段有很高比率的傷害，且對癒傷組織形成的比率偏低(表2)。

三、聖誕紅莖段培植體之基因轉殖與植株再生

聖誕紅‘Nobel Star’和‘Peter Star-White’莖段培植體經農桿菌感染後，將培植體移至含5 mg/l hygromycin 和500 mg/l timetin 抗生素之癒傷組織誘導培養基中，大約第2週後莖段培植體開始膨大(圖1A下)，第4週後於切口開始長出黃綠色疏松狀癒傷組織之後，癒傷組織分佈整個培植體(圖1B下)，癒傷組織生長的同時亦伴隨著局部開始褐化。在第8週時，將培植體移至含5 mg/l hygromycin 和500 mg/l timetin 抗生素之體胚發育培養基；第12週後，癒傷組織逐漸分化形成體胚(圖1A上)，並將體胚移至含5 mg/l hygromycin 和250 mg/l timetin 抗生素之體胚伸長培養基；經過第14週後，體胚成熟並伸長(圖1C下)；在第16週後，體胚繼續分化並增殖(圖1C上)；再經過數次繼代培養，大約第24週後體胚發育成

表 2. 抗生素對聖誕紅癒傷組織形成之影響

Table 2. Effects of antibiotics on the callus formation of poinsettia stem explants.

Cultivar	Antibiotics	Browning (%)	Callus formation (%) ^z
'Nobel Star'	None	6.3 d ^y	93.7 a
	Cefotaxime	73.0 b	27.0 c
	Carbenicillin	82.3 a	17.7 d
	Timetin	50.0 c	50.0 b
	None	4.0 c	96.0 a
'Peter Star-White'	Cefotaxime	85.7 a	14.3 c
	Carbenicillin	75.3 b	24.7 b
	Timetin	72.0 b	28.0 b

^z 培養 4 週後調查。

^y 同行字母相同者表示經 LSD 分析結果無顯著差異。

^z Investigations were conducted at 4 weeks of culture.

^y Means with the same letter in a column are not significantly different by LSD test at $p \leq 0.05$ level.

為再生芽體(圖 1C 上下, 1D 上下)。大約第 32 週後, 抗性芽體可發育再生成植株(圖 1E 上下)。再取具有抗性之無菌苗進行 PCR 篩選, 確定是否為轉殖植株。並將陽性反應植株之無菌插穗扦插於泡棉, 置於噴霧扦插床使其發根。並按聖誕紅盆花栽培方法管理直到轉殖株轉色開花(圖 1F 上下)。

四、農桿菌基因轉殖效率

聖誕紅 'Nobel Star' 莖段培植體經由農桿菌轉殖 F3H、F3',5'H 和 ANS 基因結果顯示, 轉殖 F3H 基因有 246 個培植體形成癒傷組織, 其中 3 個培植體有分化體胚, 體胚再生率為 1%, 芽體篩選再生率為 11.7%, 共獲得 10 株具抗性之轉殖株, 經由 PCR 分子檢測, 篩選獲得 4 株含有 F3H 基因之轉殖株, 轉殖效率約 1.3%。轉殖 F3',5'H 有 240 個培植體形成癒傷組織, 其中 2 個培植體有分化體胚, 體胚再生率為 0.7%, 芽體篩選再生率為 7.7%, 但並未篩選到具抗性之轉殖株。而轉殖 ANS 基因有 180 個培植體形成癒傷組織, 其中 2 個培植體有分化體胚, 體胚再生率為 0.7%, 芽體篩選再生率為 15.3%, 共獲得 8 株具抗性之轉殖株, 經由 PCR 分子檢測, 篩選到 7 株含有 ANS 基因之轉殖株, 轉殖效率約 2.3% (表 3)。

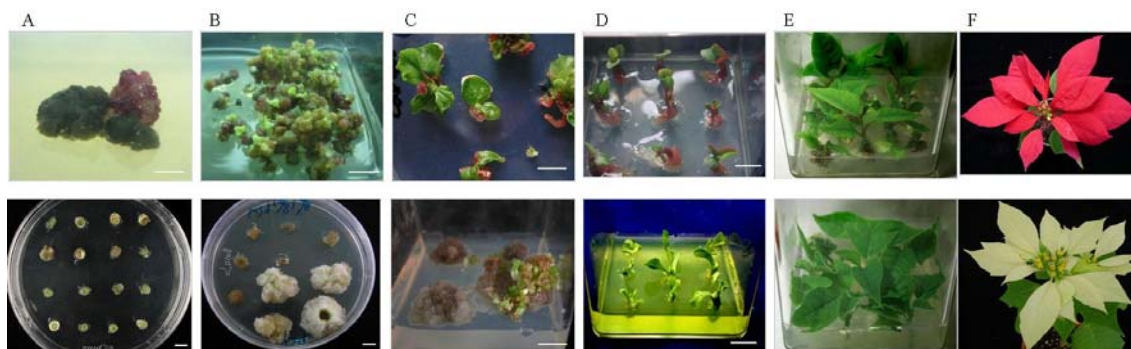


圖 1. 聖誕紅體胚分化與基因轉殖流程。‘Nobel Star’(上圖)，‘Peter Star-White’(下圖)。A. 農桿菌感染後，第 2 週莖段培植體開始膨大(下)，第 12 週自癒傷組織誘導體胚分化(上)；B. 第 4 週，莖段誘導癒傷組織之生長情形(下)，第 16 週體胚繼續分化並增殖(上)；C. 第 14 週，體胚成熟並伸長(下)；D. 第 24 週後，自體胚分化之再生植株；E. 第 32 週，抗性轉殖株再生；F. 溫室中的轉基因植株轉色與開花。(bar=10 mm)。

Fig. 1. Process of somatic embryogenesis and transgenic regeneration of poinsettia. ‘Nobel Star’ (upper) and ‘Peter Star-White’ (lower). A. stem explants expansion in the 2nd week (lower), somatic embryos on the callus in the 12th week(upper) ; B. callus induced from stem explant in the 4th week(lower), somatic embryos developed in the 16th week (upper) ; C. somatic embryos mature and elongation in the 14th week(lower) ; D. plantlets regenerated from somatic embryos in the 24th week ; E. transgenic plants regeneration in the 32nd week ; F. plants established and flowering in the greenhouse. (bar=10 mm)

‘Peter Star-White’莖段培植體經由農桿菌轉殖F3H、F3’,5’H和ANS基因結果顯示，轉殖F3H基因有174個培植體形成癒傷組織，其中3個培植體有分化體胚，體胚再生率為1%，芽體篩選再生率為19.3%，共獲得35株具抗性之轉殖株，經由PCR分子檢測，篩選獲得19株含有F3H基因之轉殖株，轉殖效率約6.3%。轉殖F3’,5’H有180個培植體形成癒傷組織，其中5個培植體有分化體胚，體胚再生率為1.7%，芽體篩選再生率為20.7%，共獲得39株具抗性之轉殖株，經由PCR分子檢測，篩選獲得23株含有F3’,5’H基因之轉殖株，轉殖效率約7.7%。而轉殖ANS基因有180個培植體形成癒傷組織，但並無任何培植體有分化體胚(表3)。

五、轉殖株之聚合酶連鎖反應分析

聖誕紅‘Nobel Star’和‘Peter Star-White’莖段培植體經由農桿菌轉殖F3H、F3’,5’H和ANS基因，經抗生素hygromycin篩選存活之再生植株；分別萃取其再生植株的葉片DNA，依照F3H、F3’,5’H和ANS基因序列所設計的特異性引子進行PCR分析，經電泳分離後結果如圖2~5所示。

表 3. 聖誕紅莖段培植體之農桿菌基因轉殖效率

Table 3. Transformation efficiency (%) of poinsettia with stem by *Agrobacterium tumefaciens*.

Transfer gene	No. of callus formation ^z	No. of somatic embryos regenerated (%)	No. of regenerated shoot (%)	No. of hygromycin resistant plant (%)	No. of transformant (%) ^y	Transformation efficiency (%) ^x
‘Nobel Star’						
F3H	246	3 (1.0%)	35 (11.7%)	10 (3.3%)	4 (1.3%)	1.3
F3',5'H	240	2 (0.7%)	23 (7.7%)	0	0	0
ANS	180	2 (0.7%)	46 (15.3%)	8 (2.7%)	7 (2.3%)	2.3
‘Peter Star-White’						
F3H	174	3 (1.0%)	58 (19.3%)	35 (11.7%)	19 (6.3%)	6.3
F3',5'H	180	5 (1.7%)	62 (20.7%)	39 (13.0%)	23 (7.7%)	7.7
ANS	150	0	0	0	0	0

^z從 300 個莖段培植體誘導形成之癒傷組織數。

^y經由 PCR 分析證實之轉殖株。

^x由 PCR 分析證實之轉殖株數/總培植體數。

^zNo. of callus formation from 300 explants.

^yTransformant verified by PCR analysis using pigment gene primer sets.

^xNumber of transformant/total number of explant.

(一) F3H 基因

以F3H基因之特異性引子分析‘Nobel Star’之10株轉殖植株進行PCR反應，除對照株和F3H-1植株外，F3H-2和F3H-4植株，皆含有674 bp的預期條帶，而F3H-2則呈現較微弱的條帶(圖2)。

另以F3H基因之特異性引子分析‘Peter Star-White’之35株轉殖植株進行PCR反應，除對照株外，F3H-1、F3H-2、F3H-4、F3H-5、F3H-6、F3H-7、F3H-8、F3H-9、F3H-10、F3H-15、F3H-16以及F3H-17等植株，皆含有674 bp的預期條帶 (圖4)。

(二) ANS 基因

以ANS基因之特異性引子分析‘Nobel Star’之8株轉殖植株進行PCR反應，除對照株和ANS-1外，ANS-2、ANS-3、ANS-4、ANS-5、ANS-6、ANS-7和ANS-8轉殖植株，皆含有401 bp的預期條帶，而ANS-6和ANS-8則呈現較微弱的條帶(圖3)。

(三) F3',5'H 基因

以F3',5'H基因之特異性引子分析‘Peter Star-White’之39株轉殖植株進行PCR反應，除對照株外，和轉殖植株F35H-4、F35H-6、F35H-7、F35H-25、F35H-26、F35H-27、F35H-28、F35H-30、F35H-31、F35H-32、F35H-33以及F35H-34等植株，皆含有410 bp的預期條帶，而F35H-6和F35H-10則呈現較微弱的條帶(圖5)。

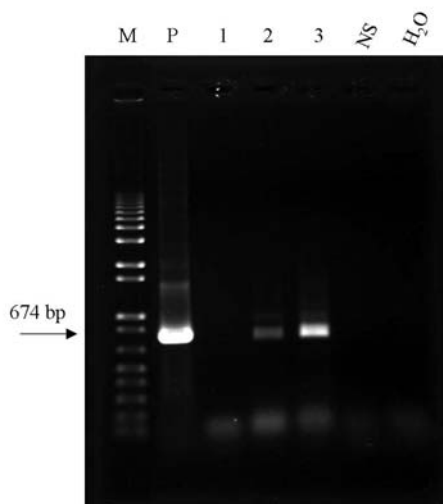


圖 2. 轉殖 F3H 基因之聖誕紅 ‘Nobel Star’ 之 PCR 篩選 M: 1Kb DNA marker; P: 含 F3H 基因之 pCAMBIA1302 質體; NS: ‘Nobel Star’; H₂O: 無菌水對照; Lanes 1-3: 轉殖 F3H 基因之 hygromycin 抗性植株分別為 F3H-1、F3H-2 和 F3H-4。

Fig. 2. PCR screening of poinsettia ‘Nobel Star’ transformed with F3H gene. M: 1kb DNA marker; P: F3H plasmid DNA; NS: ‘Nobel Star’; Lanes 1-3: hygromycin resistant plants transformed with F3H gene, F3H-1, F3H-2 and F3H-4, respectively.

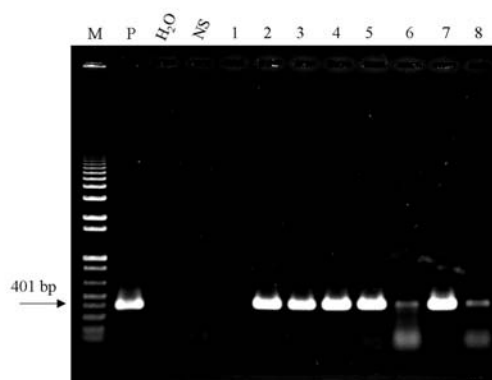


圖 3. 轉殖 ANS 基因之聖誕紅 ‘Nobel Star’ 之 PCR 篩選

M: 1kb DNA marker; P: 含 ANS 基因之 pCAMBIA1300 質體; NS: ‘Nobel Star’; H₂O: 無菌水對照; Lanes 1-8: 轉殖 ANS 基因之 hygromycin 抗性植株 DNA, 分別為 ANS-1~ANS-8。

Fig. 3. PCR screening of poinsettia ‘Nobel Star’ transformed with ANS gene. M: 1Kb DNA marker; P: ANS plasmid DNA; NS: ‘Nobel Star’; Lanes 1-8: hygromycin resistant plants transformed with ANS gene, ANS1~ANS-8, respectively.

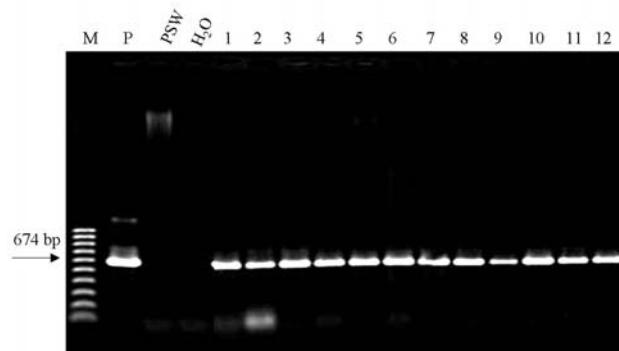


圖 4. 轉殖 F3H 基因之聖誕紅 'Peter Star-White' 之 PCR 篩選

M : 1Kb DNA marker ; P : 含 F3H 基因之 pCAMBIA1302 質體 ; PSW : 'Peter Star-White' ; H₂O : 無菌水對照 ; Lanes 1-12 : 轉殖 F3H 基因之 hygromycin 抗性植株 DNA , 分別為 F3H-1、F3H-2、F3H-4、F3H-5、F3H-6、F3H-7、F3H-8、F3H-9、F3H-10、F3H-15、F3H-16、F3H-17 。

Fig. 4. PCR screening of poinsettia 'Peter Star-White' transformed with F3H gene. M: 1Kb DNA marker; P: F3H plasmid DNA; PSW: 'Peter Star-White'; Lanes 1-17: hygromycin resistant plants transformed with F3H gene, F3H-1, F3H-2, F3H-4, F3H-5, F3H-6, F3H-7, F3H-8, F3H-9, F3H-10, F3H-15, F3H-16, F3H-17, respectively.

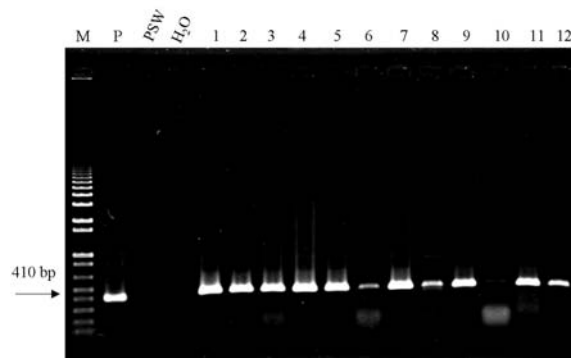


圖 5. 轉殖 F3',5'H 基因之聖誕紅 'Peter Star-White' 之 PCR 篩選

M : 1Kb DNA marker ; P : 含 F3',5'H 基因之 pCAMBIA1300 質體 ; PSW : 'Peter Star-White' ; H₂O : 無菌水之對照 ; Lanes 1-12 : 轉殖 F3',5'H 基因之 hygromycin 抗性植株 DNA , 分別為 F35H-4、F35H-6、F35H-7、F35H-25、F35H-26、F35H-27、F35H-28、F35H-30、F35H-31、F35H-32、F35H-33、F35H-34 。

Fig. 5. PCR screening of poinsettia 'Peter Star-White' by transfer F3',5'H gene. M:1Kb DNA marker;P:F35H plasmid DNA as positive control;PSW:'Peter Star-White';Lanes 4-34:hygromycin resistant plants transformed with F3',5'H (F35H)gene, F35H-4, F35H-6, F35H-7, F35H-25, F35H-26, F35H-27, F35H-28, F35H-30, F35H-31, F35H-32, F35H-33, F35H-34, respectively.

討 論

進行植物農桿菌基因轉殖時，需將欲轉殖的組織與含有目標基因的農桿菌，共培養1-3天。共培養之後，農桿菌生長必須被抑制，使轉殖植物細胞的生長和發育不受干擾。若無法防止農桿菌生長，則會抑制轉殖植物細胞的增殖和發育，甚至造成植株死亡(Horsch et al., 1985)。抑制農桿菌最常使用的方法，係將感染後的植物組織移到含有抑制農桿菌的抗生素培養基中，常用的抗生素種類有cefotaxime、carbenicillin和timentin (Opabode, 2006)。

Cefotaxime與carbenicillin屬於penicillin類抗生素，具有分解 β -lactamases的構造，這兩種抗生素主要是抑制細菌細胞壁的合成，且可以有效的抑制農桿菌的生長(Okkels and Pedesen, 1988)，但是對芥屬(*Brassica*)、茄屬(*Solanum*)和懸鉤子屬(*Rubus*)植物的細菌卻無顯著的抑制作用(Barrett et al., 1997)。Carbenicillin是小麥和玉米進行農桿菌基因轉殖最常使用的抗生素(Opabode, 2006)。在菸草的原生質體培養中發現，carbenicillin的毒性比cefotaxime低(Pollock et al., 1983)。但cefotaxime在培養過程中對植物的毒性比carbenicillin低，且cefotaxime濃度在60-100 mg/l的範圍具有促進小麥的癒傷組織生長、體胚形成與再生的功能(Mathias and Boyd, 1986)。目前已有許多植物組織均可以適應高濃度的carbenicillin或cefotaxime(在250-500 mg/l濃度之間)，例如番木瓜(*Carica papaya*)(Yang et al., 1996)，因carbenicillin的化學結構與auxin具有相似之處，且類似2-4,D或NAA，當carbenicillin與2-4,D結合後，具有高auxin的活性，且會產生毒性，反而抑制細胞的生長(Lin et al., 1995)。在香石竹的研究發現，carbenicillin、cefotaxime與timentin均能增加葉片組織的再生能力，推測此類抗生素與auxin的化學結構相似，亦與培養基中的auxin之交互作用所產生的結果有關(Estopa et al., 2001)。Cefotaxime的結構與carbenicillin和penicillin G的化學結構相似(Ling et al., 1998)。在松樹的試驗中也發現，cefotaxime可能會與植物激素產生交互作用，而影響植物細胞的代謝與生長(Humara and Ordas, 1999)。在500 mg/l cefotaxime和1000 mg/l carbenicillin的條件下可以抑制農桿菌生長，但1000 mg/l carbenicillin則會抑制菸草的葉圓片和子葉的芽體再生，而500 mg/l cefotaxime則抑制子葉的芽體再生，卻不影響其葉圓片的芽體再生(Nauerby et al., 1997)。Cefotaxime在100-500 mg/l濃度下亦能促進石竹屬(*Dianthus*)的體胚形成(Nakano and Mii, 1993)，在250 mg/l濃度下亦能增加蘋果葉圓片芽體的再生與發育(Yepes and Aldwinckle, 1994)。但在cefotaxime高濃度下(375-500 mg/l)癒傷組織的生長能力降低，而體胚形成未受影響(Yu et al., 2001)。在雲杉屬(*Picea*)中，carbenicillin會降低癒傷組織的生長(Sarma et al., 1995)。且carbenicillin在250-500 mg/l濃度下能促進金魚草(*Antirrhinum majus*)癒傷組織的形成和不定芽的生長(Hammerschlag et al., 1997)。而carbenicillin在500 mg/l濃度下雖能誘發蘋果葉圓片癒傷組織的形成卻會抑制芽體再生(Yepes and Aldwinckle, 1994)。Carbenicillin在高濃度下(375-500 mg/l)能促進番木瓜癒傷組織的生長和體胚形成(Yu et al., 2001)。

從聖誕紅‘Nobel Star’和‘Peter Star-White’莖段培植體在含500 mg/l timentin抗生素培養基對培植體的傷害最低，且癒傷組織形成率最高。Timentin對癒傷組織的誘導和芽分化影

響不大，且在植物常用來抑制基因轉殖中細菌的生長(Cheng et al, 1998)。而‘Nobel Star’的莖段培植體在含500 mg/l的cefotaxime抗生素培養基比在含500 mg/l carbenicillin的抗生素培養基中培植體的傷害較低，且癒傷組織形成率較高。此結果與Mathias和Boyd(1986)的結果相符，顯示cefotaxime在培養中對植物的毒性比carbenicillin低，且carbenicillin也會減少雲杉屬癒傷組織的生長(Sarma et al., 1995)。但‘Peter Star-White’莖段培植體在含500 mg/l的cefotaxime抗生素培養基比在含500 mg/l carbenicillin的抗生素培養基中培植體的傷害卻較高，而癒傷組織形成率反而較低，故推測抗生素對品種之間呈現差異性。因此建議在未來的聖誕紅基因轉殖試驗中，選擇以timentin作為抑制農桿菌的抗生素，應有較好的結果。在基因轉殖過程中，timentin比cefotaxime、carbenicillin更可抑制農桿菌的生長(Cheng et al.,1998)。

透過體胚再生系統進行基因轉殖，將bar基因轉入輻射松(*Pinus radiata*)，可成功再生轉植株且外源基因可穩定表現，此證明利用體胚再生方法可建立穩定的基因轉殖系統(Charity et al., 2005)。木薯(*Manihot esculenta*)利用體胚再生方法可成功獲得轉植株，其轉殖效率約為0.2%~1.2%(Zhang et al., 2000)。在聖誕紅以莖段進行農桿菌基因轉殖的研究方面，目前僅有將poinsettia mosaic virus(*PnMV*)基因轉殖至聖誕紅‘Millenium’中，轉殖效率平均為2.1% (Clarke et al., 2008)。而本研究結果經PCR篩選後之轉殖效率最高可達7.7%，較已發表的轉殖效率提高3倍以上。

參 考 文 獻

- 朱建鏞。趙玉真。2002。聖誕紅經由懸浮培養之體胚形成。中國園藝。48:247-256。
- 朱建鏞。馮莉真。2003。聖誕紅‘光輝’之微體繁殖。植物種苗。5:47-60。
- 邱銘鳳。1998。黑色大豆種皮Flavanone 3-hydroxylase (F3H)基因之選殖。國立中興大學農業生物科技學研究所碩士論文。77 pp.。
- 黃靖雯。2002。黑色大豆種皮ANS基因之選殖。國立中興大學農藝學研究所碩士論文。128 pp.。
- 趙玉真。朱建鏞。2000。聖誕紅之莖頂培養。興大園藝。25:67-81。
- Barrett, C. C., E. M. Nicol, and L. G. Ronald. 1997. A risk assessment study of plant genetic transformation using *Agrobacterium* and implications for analysis of transgenic plants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 47:135-144.
- Charity, J. A., L. Holland, and L. J. Grace. 2005. Consistent and stable expression of the *nptII*, *uidA* and *bar* genes in transgenic *Pinus radiata* after *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation using nurse cultures. *Plant Cell Rep.* 23:606-616.
- Cheng, 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.
- Clarke, J. L., C. Spetz, S. Haugslie, S. Xing, M. W. Dees, R. Moe, and D. R. Blystad. 2008. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of poinsettia, *Euphorbia pulcherrima*, with virus-derived hairpin RNA constructs confers resistance to poinsettia mosaic virus. Plant Cell Rep. 27:1027-1038.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull. 19:11-15.
- Estopa, M., V. Marfa, E. Mele, and J. Messeguer. 2001. Study of different antibiotic combinations for use in the elimination of *Agrobacterium* with kanamycin selection in carnation. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 65:211-220.
- Hammerschlag, F. A., R. H. Zimmerman, U. L. Yadava, S. Hunsucker, and P. Gercheva. 1997. Effect of antibiotics and exposure to an acidified medium on the elimination of *Agrobacterium tumefaciens* from apple explants and on shoot regeneration. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 122:758-763.
- Horsch, R. T., 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 227:1229-1231.
- Humara, J. M. and R. J. Ordás. 1999. The toxicity of antibiotics and herbicides on *in vitro* adventitious shoot formation on *Pinus pinea* L. cotyledons. In Vitro Cell. Dev. Biol. 35:339-343.
- Liao, R. M., T. M. Chu, and C. S. Wang. 2005. Molecular cloning and characterization of a cluster of genes encode two types of chalcone isomerases in soybean. Chinese Society of Agronomy. April 20, Chia-Yi.
- Lin, J. J., N. Assadgarcia, and J. Kuo. 1995. Plant hormone effect of antibiotics on transformation efficient of plant tissue by *Agrobacterium tumefaciens* cells. Plant Sci. 109:171-177.
- Ling, H. Q., D. Kirseleit, and M. W. Ganal. 1998. Effect of ticarcillin/potassium clavulanate on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). Plant Cell Rep. 17:843-847.
- Mathias, R. J. and L. A. Boyd. 1986. Cefotaxime stimulates callus growth, embryogenesis and regeneration in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*). Plant Sci. 46:217-223.
- Nakano, M. and N. Mii. 1993. Antibiotics stimulate somatic embryogenesis without plant growth regulators in several *Dianthus* cultivars. Plant physiol. 141:721-725.
- Nauerby, B., K. Billing, and R. Wyndaele. 1997. Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration compared to carbenicillin and cefotaxime in concentration suitable for

- elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Sci. 123:169-177.
- Opabode, J. T. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of plants:emerging factors that influence efficiency. Biotechnol. Mol. Bio. Rev. 1:12-20.
- Okkels, E. T. and M. G. Pedersen. 1988. The toxicity to plant tissue and to *Agrobacterium tumefaciens* of some antibiotics. Acta Hort. 225:199-207.
- Pollock, H. M., J. Holt, and C. Murray. 1983. Comparison of susceptibilities of anaerobic bacteria to cefemenoxime, ceftriaxone, and other antimicrobial compounds. Antimicrob. Agents Chemother. 23:780-783.
- Sarma, K. S., N. E. Evans, and C. Selby. 1995. Effect of carbenicillin and cefotaxime on somatic embryogenesis of Sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.). J. Exp. Bot. 45:1779-1781.
- Stewart, R. N., S. Asen, D. R. Massie, and K. H. Norris. 1979. The identification of poinsettia cultivars by HPLC analysis of their anthocyanins content. Biochem. Syst. Ecol. 7:281-287.
- Vik, N. I. 2003. Genetic transformation of poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*). Doctor Scientiarum Thesis. 21: Agricultural University of Norway.
- Vik, N. I., A. K. H. Eide, H. Gjerde, and K. Bakke. 2001. Stable transformation of poinsettia via electrophoresis. Acta Hort. 560:101-103.
- Yang, J. S., T. A. Yu, Y. H. Cheng, and S. D. Yeh. 1996. Transgenic papaya plants from *Agrobacterium*-mediated transformation of petioles of *in vitro* propagated multishoots. Plant Cell Rep. 15:459-464.
- Yepes, L. M. and H. S. Aldwinckle. 1994. Factors that affect leaf regeneration efficiency in apple, and effects of antibiotics in morphogenesis. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 37:257-269.
- Yu, T. A., S. D. Yeh, and J. S. Yang. 2001. Effects of carbenicillin and cefotaxime on callus growth and somatic embryogenesis from adventitious roots of papaya. Bot. Bull. Acad. Sin. 42:281-286.
- Zhang P. and J. P. Kaerlas. 2000. PIG-mediated cassava transformation using positive and negative selection. Plant Cell Rep. 19:1041-1048.

Transformation of Pigment Genes to Poinsettia

Tsui-Feng Li¹⁾ Chang-Sheng Wang²⁾ Chien-Young Chu³⁾

Key words : *Euphorbia pulcherrima*, Embryogenesis, *Agrobacterium tumefaciens*, Seed coat of soybean

Summary

Transformed poinsettia 'Nobel Star' and 'Peter Star-White' with *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 carrying seed coats of soybean genes -flavonoid 3-hydroxylase (F3H) and flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3',5'H) and anthocyanidin synthase (ANS) *via* embryogenesis. Antibiotic concentration of screening from 'Nobel Star' and 'Peter Star-White', regard 5 mg/l hygromycin as and screen the basis that adds antibiotic in culture medium. The timentin could be used to inhibit *Agrobacterium tumefaciens* growth and showed the lowest toxicity on stem, formation rate of callus that was relatively high and continued proliferation. It had 20.7% resistant shoots regenerated with stem in selection medium about 24 weeks. Putative transformants of poinsettia 'Nobel Star' verified by PCR analysis, to obtain 5 or 7 transgenic plants transformed with F3H or ANS gene and the transformation efficiency were 1.3% and 2.3%, respectively. Putative transformants of poinsettia 'Peter Star-White' were verified by PCR analysis, to obtain 5 or 7 transgenic plants by transformed with F3H and F3',5'H gene, and transformation efficiency were 6.3% and 7.7%, respectively.

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

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

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

