

# 簡單有效的農桿菌接種方法及其發展潛力

◎林業試驗所育林組·張淑華 (shsh624@gmail.com)

## 前言

農桿菌最早於1897年由義大利的Fridiano Cacara 博士在葡萄上發現，葡萄感染農桿菌的部位會產生如腫瘤般脹大的病徵，隨後陸續在許多植物上也發現此現象。植物感染農桿菌後除了會產生腫瘤，有些會產生毛狀根，且此現象在自然界中以雙子葉植物居多。

經研究發現農桿菌有兩型，分別為農桿菌(*Agrobacterium tumefaciens*)帶有Ti 質體與農桿叢根菌(*A. rhizogenes*)帶有Ri質體。Ti 與Ri質體都有一段T-DNA，此T-DNA含有植物生長調節劑基因，在農桿菌感染植物時，T-DNA會插入植物體的基因體中，使得植物細胞開始大量產生生長素(auxin)與細胞分裂素(cytokinin)，這兩種賀爾蒙相加的結果，會使得細胞開始分裂增生，於是就產生腫瘤(農桿菌)或毛狀根(農桿叢根菌)。

這種由農桿菌感染植物，把農桿菌的



臺灣紅豆杉野生型農桿菌接種產生之腫瘤細胞。  
(張淑華 攝)

T-DNA插入植物體DNA的現象，已被科學家用來將一些外來基因，先放入農桿菌的T-DNA中，再轉殖到植物體基因裡，而培育出許多轉基因植物。T-DNA沒被改造過的農桿菌，我們稱之為野生型農桿菌或野生型農桿叢根菌。

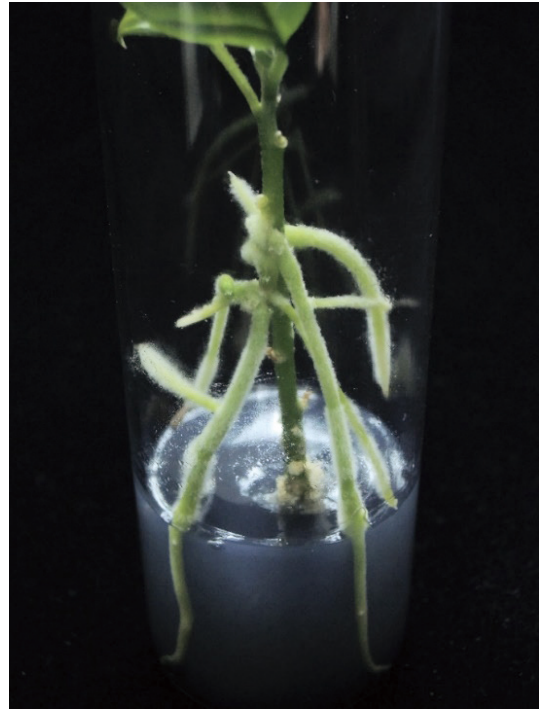
自然界中農桿菌感染植物以雙子葉植物較常見，在實際應用上，也是以雙子葉及草本植物比較容易接種農桿菌，而單子葉及裸子植物在接種農桿菌的成功率就相對低很多。我們實驗室以簡單的接種方式，成功的將野生型農桿菌或農桿叢根菌基因接種於臺灣紅豆杉、臺灣杉、臺灣粗榧、肖楠等裸子植物及青脆枝、喜樹等雙子葉木本植物來產生毛狀根或腫瘤細胞。

## 接種方法

1. 植物材料：以試管無菌苗或莖芽作為試驗材料。
2. 農桿菌準備：農桿菌以YEB培養基於200 rpm轉速震盪器，在黑暗28℃培養24小時。
3. 農桿菌接種與轉基因細胞誘導：將試管莖芽或小苗取出，放在無菌的濾紙上，在莖的節間部分，以解剖針刺傷或解剖刀刮傷莖段，再以消毒過之棉花沾農桿菌液，塗於莖的傷口上，靜置數分鐘，將小苗或莖芽放回試管中培養(注意：塗抹之菌液不可過多，否則菌液流到培養基，會造成污染)。經培養1個月後，在莖段接種處會產生少許癒合組織，隨後接種農桿菌會產生



臺灣紅豆杉野生型農桿叢根菌接種產生之毛狀根。  
(張淑華 攝)

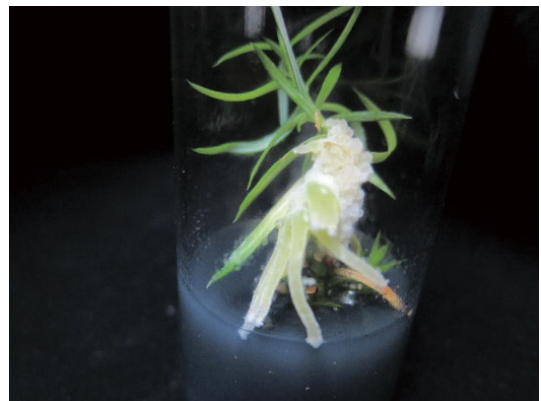


青脆枝毛狀根。(張淑華 攝)

腫瘤細胞，接種農桿叢根菌則發育出毛狀根。

4. 腫瘤細胞或毛狀根培養：待腫瘤細胞長大或毛狀根長度大於1 cm後，可小心將新生的腫瘤細胞或毛狀根尖切下培養，此部位的細胞不帶有農桿菌，可不需殺菌，直接培養於簡單不含抗生素的培養基中生長。
5. 與一般接種方法之比較的最大差別

一般農桿菌接種之植物材料與方法：以植物的葉片或莖段為材料，將葉片切成 $0.5 \times 0.5 \text{ cm}^2$ ，莖段切成0.5~0.8 cm大小，加入新鮮培養的菌液浸泡5~10分鐘，取出培植體以無菌的濾紙吸去多餘的菌液，再將培植體與農桿菌共同培養於固體培養基1~3



粗榧毛狀根。(張淑華 攝)

天，使農桿菌的T-DNA可插入植物體。

一般農桿菌殺菌方式：培植體與農桿菌共同培養後，以無菌水洗去培植體上的農桿菌，再將培植體浸泡於抗生素0.5~2小時，

隨後培養於添加抗生素的培養基中，每個星期換1次培養基，共培養4~8星期，以殺死農桿菌。之後將培植體培養於不含抗生素的培養基。而上述我們接種農桿菌方式是不需經過殺菌步驟，直接切下新生的腫瘤細胞或根尖培養。

### 發展潛力

腫瘤細胞與毛狀根由於具有植物生長調節劑基因，可以在不含有植物生長調節劑的培養基中快速生長，因而在長期培養下，其基因穩定不易產生突變，極具生產植物二次代謝物潛力，尤其是毛狀根可當作天然植物工廠，應用於生產藥物、食品調味料及其他商業產品，是其它植物細胞或癒傷組織培養



生物反應器培養青脆枝毛狀根。(張淑華 攝)



臺灣杉毛狀根。(張淑華 攝)

無法作到，尤其是對於有用化合物是積聚於根部的，更是適合利用毛狀根來生產。

我們已成功將野生型農桿菌基因轉到臺灣紅豆杉、臺灣杉、臺灣粗榧、肖楠、青脆枝與喜樹，誘導出腫瘤細胞或毛狀根，其轉殖率很高在60%以上。其中臺灣紅豆杉、臺灣粗榧、青脆枝與喜樹的腫瘤細胞、毛狀根或毛狀根的癒合組織，可生產治療癌症的紫杉醇、粗榧鹼或喜樹鹼類化合物。這些毛狀根與毛狀根的癒合組織生長快速，容易於生物反應器培養，可應用於大量生產有用的抗癌藥物。☼