

漫談新興育種技術 與番茄原生質體培養系統之應用

農試所生技組 夏奇鈺 游舜期 杜元凱 曹進義

一、前言

品種改良是糧食生產的基石也是農業進步的根本，在受到氣候變遷、戰爭、或疫情影響而面臨糧食缺乏挑戰時，種苗往往被歸屬為廣義之戰略物資，必須加以保護或管制以確保國家的糧食安全。利用傳統育種方法育成一個新品種所需時間平均約8-10年，而基改作物因必須針對其安全性加以評估，上市所需時間更長達8-12年，因此只有少數國際級之大型種子公司具有參與開發的能力。雖然世界各國對基改作物的看法與立場不一，但依據國際農業生物技術應用推廣協會 (ISAAA) 公布之《2018全球基因改造作物商業化種植現況》年度報告，基改作物自1996年首次開放商業化種植以來，種植面積從最初的170萬公頃，一路上升至2018年的1.917億公頃，近年來之增幅雖然趨緩，但以2018年與前一年相較，仍續增了190萬公頃。從另一角度來看，即便是對基改作物抱持著反對立場的歐盟國家也高度仰賴基改作物原料，在2017年進口了6.2千萬公噸的基改玉米、3.3千萬公噸的基改大豆，以及超過3.8百萬公噸的基改油菜及其副產物，雖然目前基改作物要在歐盟市場商品化的時間看似遙遙無期，但隨著各種創新育種技術不斷開發出來，藉由新科技克服過往對基改作物之各種疑慮確實有其可行性。

二、新興育種技術興起

以Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR-associated protein 9 (CRISPR/Cas 9) 方法進行基因編輯 (gene editing) 是近年來受到科學界矚目的新科技，運用此一技術於植物品種改良能更精準的修正遺傳物質，為物種改良帶

作者：夏奇鈺研究員
連絡電話：04-23317327

來極大之契機 (Jaganathan *et al.* 2018)。技術本身主要是利用定點核酸酶 (site-directed nuclease) 辨識基因組上的特定序列加以剪切，造成DNA序列改變，若因此造成基因無法正常讀序，便形成所謂剔除 (knock-out) 突變體，此種形式之基因編輯與傳統利用物理、化學或自然產生之突變並無相異之處，因此在「卡塔赫納生物安全議定書」(Cartagena Protocol on Biosafety) 中，傾向不被視為基因改造生物體。此外，若配合特定的轉殖技術，在基因編輯後並不會留下任何之外源基因。就此點而言，即與過去基改作物在其基因體上所受到之改變有著本質上的差異，某些國家因此將基因編輯作物從基改管理中豁免出來，許多中小型種苗公司遂有機會利用此一技術參與新品種的育成，可以預期未來種苗產業百家爭鳴時代的來臨。利用基因編輯技術將CRISPR/Cas 9核糖核蛋白 (ribonucleoprotein, RNP) 送入細胞中，且避免轉殖載體如農桿菌本身或其所攜帶外源基因的導入，獲得無外源基因導入之基因編輯植株是目前認為較為理想之DNA-free轉殖策略，但如何讓大分子之RNP不受到植物細胞特有之細胞壁的阻擋，經由細胞膜直接進入細胞之中，除了利用轉殖法中如聚乙二醇法 (polyethylene glycol, PEG) 或電穿孔法之外，還必須配合使用已去除細胞壁之原生質體方能成功完成轉植。由此看來，一個具有再生能力之原生質體培養系統是利用此一轉殖策略必要之元素，這也

凸顯出作物本身組織培養的特性，有可能成為未來基因編輯技術應用的關鍵決勝點。以下將以番茄為例，介紹原生質體培養的過程。

三、番茄原生質體培養

番茄是全球性的重要蔬果，對滿足人類營養需求有極大貢獻，番茄作為指標作物其相關組織培養之研究相當豐富，包括種苗大量繁殖、細胞培養、單倍體培養、體細胞雜交等 (Bhatia *et al.* 2004)。番茄原生質體培養研究始於1970年代，在80至90年代仍有許多研究投入，當時建立原生質體培養系統的主要目的在進行體細胞融合 (somatic hybridization)，但隨著基因轉殖技術興起後，大多數之研究改以具有再生力之細胞或組織直接進行轉殖，原生質體培養系統則因技術門檻較高、再生所需時間較長或再生率偏低而不再受到重視，從而造成之後長時間的研究斷層。檢視植物原生質體培養系統的建立，可將其概括分為原生質體分離與原生質體再生兩大部分，原生質體分離的效率可從原生質體之分離量 (每克鮮重可分離之細胞數) 來評估，一般受到材料來源、前處理及酵素處理的影響；原生質體再生則可利用平板接種效率 (plating efficiency) 來評估，一般受到原生質體的活性、接種密度以及再生培養基成分影響 (Chen *et al.* 1994, Hossain *et al.* 1995, Davey *et al.* 2010)。茲以番茄原生質體分離與再生之過程，依序分述如下：

材料來源—原生質體的最佳來源為葉片之葉肉細胞，葉片材料可取自田間、溫室或瓶苗，葉片包括如子葉、真葉以及不同葉齡葉片，外在環境(長日、低光照)與葉片本身之生理狀態對於後續原生質體品質的影響常容易被忽略。一般而言，無菌播種長出之子葉以及瓶苗之幼嫩葉片(圖一)，因其發育階段為幼年期，且具有無菌之特性，較取自田間或溫室之葉片更適合作為原生質體分離之材料，其優點包括碎片雜質較少、品質較穩定以及較低的污染率。

前處理—針對施於植株或葉片之前處理，主要在幫助葉片細胞適應酵素處理逆境、減少細胞褐化以及提高原生

質體的數量與品質，更重要的是啟動細胞的競爭力(competence)奠定細胞再生之基礎。一般以植株進行暗處理、低溫處理以及將葉片施以漸進式膜壁分離(plasmolysis)來達成。

酵素處理—目的在破壞植物細胞特有之細胞壁，將其內之葉肉細胞析出，得到只具細胞膜且各自獨立的原生質體。破壞細胞壁之酵素種類主要是果膠及纖維素酵素，不同物種可針對酵素的種類、處理濃度及處理時間加以適當調整，上述因子將直接影響原生質體析出之效率，但追求高析出率必須兼顧原生質體的品質，否則將影響到後續細胞的活性與接種效率。圖二為去除細胞壁含

有多量葉綠體之番茄葉肉細胞原生質體。高活性的原生質體是進行PEG或電穿孔轉殖方法的最佳材料，大分子之RNP在適當轉殖方法配合下，有機會穿過細胞膜進入細胞之中，繼而進行基因編輯的工作。

平板接種—單細胞之原生質體相當脆弱，轉殖後之原生質體更有過之，其生長受到培養基、培養環境及細胞群體效應的影響，接種細胞數太高易造成細胞間的營養競爭，但細胞密度太低則不利於細胞生長，必須依照培養階段將接種數量及培養基成分加以適當調整，才能幫助細胞順利生長。

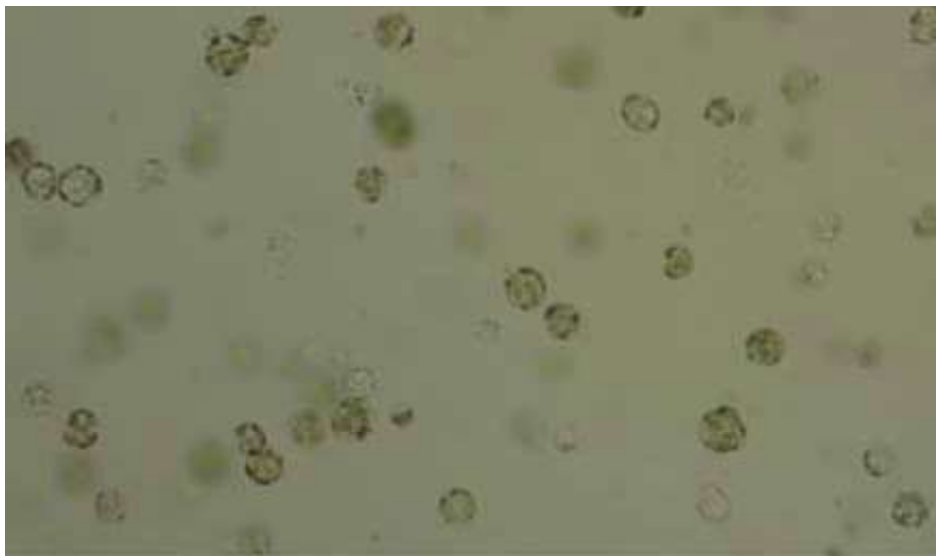


圖一、利用番茄瓶苗葉片作為分離葉肉細胞原生質體之材料。

細胞再生—由原生質體長出之細胞團塊 (癒傷組織) 或體胚細胞在生長至一定大小後，必須將上述新生組織繼代至再生培養基中促進芽體的生長，再生培養基中通常添加有促進芽體再生的植物生長調節劑，在芽體長出後再繼代至不含生長調節劑或少量生長素 (auxin) 的培養基中促進根系生長，最後發育成為一個完整之植株。

四、結語

運用基因編輯技術於作物育種具有相當寬廣的發展空間，但必須靠組織培養、分子遺傳研究人員以及育種家的密切合作方能完成，儘管分子生物領域不斷有新的發現與突破，但囿於生物特性仍強烈主宰著個別作物的再生反應，番茄原生質體培養系統當然也不例外，因此組織培養學者必須持續投入更多之努力來提高原生質體的培養效率，讓新興育種技術在實現產業化的道路上更加平坦易行。



圖二、以番茄瓶苗之葉片為材料分離出來之葉肉細胞原生質體。

五、參考文獻

- Bhatia P., N. Asheath, T. Senaratna, D. Midmore. 2004. Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicum esculentum*). *Plant Cell, Tiss Org Cult* . 78: 1-21.
- Chen LanZhuang and T. Adachi. 1994. Plant regeneration *via* somatic emcryogenesis from cotyledon protoplasts of tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.). *Breeding Sci.* 44: 257-262.
- Davey M. R., P. Anthont, D. Patel and J. B. Power. 2010. Plant protoplasts: isolation, culture and plant regeneration. in *Plant Cell Culture: Essential Methods*, eds M. R. Davey and P. Anthony. John Wiley and Sons. Pp 153-173.
- Hossain M., S. Imanishi and Egashira H. 1995. An improvement of tomato protoplast culture for rapid plant regeneration. *Plant Cell, Tiss Org Cult* 42: 141-146.
- Jaganathan, D., Ramasamy K., Sellamuthu G., Jayabalan S. and Venkataraman G . 2 0 1 8 . CRISPR for crop improvement: an update review. *Front. Plant Sci.* 9: article 985, pp 1-17.