研究報告

轉殖木質素生合成調控基因赤桉芽體之發根誘導、馴化與後續生長

何雅齡[1] 廖宇賡[2*]

（收件日期：民國111年7月19日、接受日期：民國111年10月13日）

【摘 要】桉樹(*Eucalyptus* spp.)應用於造紙已行之有年，其育種方向以提高製漿率及降低製漿成本爲首要目標，而使用基因轉殖(genetic transformation)的方法，可以較傳統育種途徑更快速達成目標。農委會林業試驗所在基因轉殖(基改)桉樹之研究已有20多年，主要是藉由調控木質素(lignin)生合成基因，以降低木質素含量來達成前述育種目標。本研究選用赤桉(*E. camaldulensis* Dehnh.) 48號營養系(Clone 48)爲對照組，並將其轉殖順義式(sense) coniferyl aldehyde 5-hydroxylase (*PtCAld5H*)基因(H204轉殖系)與反義式(antisense) Eucalyptus 4-coumarate: CoA ligase (*Euc4CL1*)基因(L103轉殖系)的組織培養芽體做爲比較之材料，進行微體繁殖。其流程參考已發表文獻中成功應用在桉樹類的培養條件，以MS medium爲基礎培養基，組合植物生長調節劑進行芽體增殖，並完成芽體抽長、發根、馴化及溫室培養等步驟，比較其在不同培養階段的生長差異，以優化基改按樹利用微體繁殖技術進行造林苗木生產的條件。結果顯示在芽體增殖階段培殖體有無保留頂芽在2.22 μM 6-benzylaminopurine (BAP)搭配0.27 μM naphthaleneacetic acid (NAA)的條件下培養，皆能獲得良好的增殖效果，其中以Clone 48及H204經8 wk培養後，單一培殖體最多可形成55~62個增殖芽體。待芽體於添加活性碳的培養基中抽長達1.5 cm時，可直接移入介質中發根及馴化，成活率可達100%。但以整體生長表現而言，L103的生長緩慢，不適栽植造林。本研究顯示同一個營養系的赤桉在轉殖不同基因後，在組培操作時，其增殖、發根難易程度及生長等性狀即會出現差異，建議這些差異可在早期作爲篩選轉殖系的依據。

【關鍵詞】馴化、桉樹、基因轉殖、木質素生合成基因、發根。

[1] 行政院農業委員會林業試驗所中埔研究中心。600054 嘉義市文化路432巷65號。
Chungpu Research Center, Taiwan Forestry Research Institute, COA, Executive Yuan. No. 65, Lane 432, Wenhua Rd., Chiayi 600054, Taiwan, ROC.
[2*] 國立嘉義大學森林暨自然資源學系，600355 嘉義市學府路300號。通訊作者。
Department of Forestry and Natural Resources, National Chiayi University. No. 300, Syuefu Rd., Chiayi 600355, Taiwan, ROC.
Corresponding Author. E-mail: ykliao@mail.ncyu.edu.tw

Research paper

ROOT INDUCTION, ACCLIMATIZATION, AND SUBSEQUENT GROWTH OF *EUCALYPTUS CAMALDULENSIS* DEHNH. MICROSHOOTS GENETICALLY TRANSFORMED BY LIGNIN BIOSYNTHESIS REGULATORY GENES

Ya-Ling Ho[1] Yue-Ken Liao[2*]

（Received: July 19, 2022; Accepted: October 13, 2022）

【Abstract】Various species of eucalyptus (*Eucalyptus* spp.) have been used to provide wood fibers for the pulp and paper industry for a long time. Breeding programs designed for eucalyptus trees mainly emphasize improving their pulping efficiency and reducing processing costs. Such manipulation can be much more quickly achieved using genetic transformation technology rather than following traditional breeding methods. The Taiwan Forestry Research Institute has carried out genetic transformation studies on eucalyptus for about 20 years. The framework of the project was to genetically regulate lignin biosynthesis genes, to thus reduce the content of lignin to match the breeding goals. The present study collected tissue-cultured microshoots of *E. camaldulensis* Dehnh. Clone 48 as a control. Microshoots of the same clone transformed using the sense coniferyl aldehyde 5-hydroxylase (*PtCAld5H*) gene (designated transgenic line H204) or the antisense eucalyptus 4-coumarate CoA ligase (*Euc4CL1*) gene (designated transgenic line L103) were used for comparison. The culture procedures adapted in this study were from documented methodologies successfully applied in other *Eucalyptus* species. Murashige and Skoog (MS) medium was selected as the basal medium which was then supplemented with a combination of plant growth regulators to promote shoot proliferation, followed by shoot elongation, rooting, acclimatization, and greenhouse growth. Variations in growth performances in each tissue culture stage were recorded and examined to optimize procedures to effectively propagate transgenic *Eucalyptus* for reforestation. The results revealed that both intact and decapitated shoot explants showed vigorous shoot proliferation when they were incubated in medium containing 2.22 μM 6-benzylaminopurine (BAP) and 0.27 μM naphthaleneacetic acid (NAA). Clones 48 and H204 gave better microshoot production (55~62 shoots per explant). Microshoots, cultured on activated charcoal-containing medium and elongated up to 1.5 cm, were suitable for direct *ex vitro* rooting and acclimatization which achieved 100% survival. However, L103 shoots exhibited very slow growth during tissue culture incubation and greenhouse cultivation. Our data suggest that while genetic transformation of *Eucalyptus* with various genes may exhibit significant differences in several growth characteristics during tissue culture operations, such profound distinctions can be considered an index for early selection before nursery or field tests.

【Key words】Acclimatization, Eucalyptus, Genetic transformation, Lignin biosynthesis gene, Rooting.

Ⅰ、前言

農委會林業試驗所針對桉樹(*Eucalyptus* spp.)的基因遺傳工程研究，於90年代開始，以改良木材性質，減少木質素(lignin)含量爲目標，使造紙工業在生產過程中可以降低製漿成本及提高得漿率。木質素是一種酚類化合物，爲次生壁主要成分，填充於細胞壁纖維素的架構中，主要作用是形成網狀結構來硬化細胞壁，在木本植物中約佔細胞壁的20~30%，僅次於纖維素。木質素有增強植物體的機械強度及支持力的功能，亦可防禦外界病原體入侵。但在製漿造紙時需耗費大量的能源及添加化學藥劑，才能去除與分解木質素，且最終形成的廢液還有污染環境的顧慮，需要再投資設備處理。因此，藉由基因調控來阻斷木質素生合成途徑，降低木質素的合成量或改變單體組成，以減少木質素的總量，可相對的增加纖維素並提高得漿率，是造紙產業可以降低成本增加收益的做法之一。

目前轉殖木質素生合成相關基因並可藉以調控木質素含量的優良赤桉(*E. camaldulensis* Dehnh.)基因轉殖系已經育成，這些轉殖系需要經過大量繁殖、育苗及造林才能提供做爲製漿原料，此過程若要維持植物基改後的特殊性狀，則需透過無性繁殖進行苗木生產。考慮到若初始繁殖材料有限或植物插穗發根困難，則無法經由扦插來穩定供苗。而組織培養的微體繁殖(micropropagation)技術能以有限的材料來達到大量繁殖的目的，不僅可充足的供應均質性的苗木，還可確保其品質、降低成本及保存種源，在實務上是一種具商業應用潛力的方法。

本研究是以優選過的赤桉Clone 48組織培養芽體爲對照組，並將其轉殖順義式(sense) coniferyl aldehyde 5-hydroxylase (*PtCAld5H*)基因或反義式(antisense) Eucalyptus 4-coumarate: CoA ligase (*Euc4CL1*)木質素生合成基因後的組織培養芽體，進行對照培養。前者在順義式*PtCAld5H*基因作用下，會改變木質素syringyl (S)與guaiacyl (G)的單體組成，形成較高的S/G比率，在製漿時可使木質素移除的速率加倍(Li *et al*., 2003)。而後者在反義式*Euc4CL1*基因表現後，會干擾該基因正常之轉譯，使主導木質素生合成之酵素含量減少，降低木質素合成量(Jia *et al*., 2004)。本研究比較這些不同轉殖系赤桉與未曾受基因轉殖的原始營養系之間，在微體繁殖時各階段的生長表現，除尋求較佳的培養條件之外，並在組織培養階段透過早期觀察，瞭解這些赤桉轉殖系芽體的生長差異性，以做爲之後篩選依據。

Ⅱ、材料與方法

(Ⅰ) 材料來源

研究材料由林業試驗所鍾振德博士提供，計有三種赤桉的組織培養芽體，分別爲赤桉Clone 48、將該Clone轉殖順義式*PtCAld5H*基因的H204轉殖系以及轉殖反義式*Euc4CL1*基因的L103轉殖系。本研究使用的培養基皆以添加2% (w/v)蔗糖及0.75% (w/v) Difco Bacto agar (pH 5.8)之MS medium (Murashige and Skoog, 1962)爲基礎培養基，先經1.2 kg cm^{-2}，121℃高溫高壓滅菌15 min，冷卻後使用。無菌芽體培養於MS

培養基中每4 wk繼代一次，以供後續試驗使用。

(II) 多芽體增殖

將三種赤桉組織培養芽體在側芽未產生時由頂端切取1.0 cm長度的單芽做爲培殖體，此芽體又以完整保留頂芽及切除頂芽處理後，植入添加2.22 μM 6-benzylaminopurine (BAP, B3408, Sigma-Aldrich, USA)及0.27 μM naphthaleneacetic acid (NAA, N0640, Sigma-Aldrich)的增殖培養基中(Brondani *et al*., 2011)。每個培養皿(直徑90 ×高20 mm)接種5個培殖體，共使用3盤(n = 15)。每4 wk繼代一次，芽體增殖數量於繼代1次(4 wk)及繼代2次(8 wk)結束後進行計數及分析比較，本試驗重複二次。

(III) 芽體發根

在進行發根試驗前，先將三種赤桉組織培養芽體增殖所得之多芽體(叢)移至添加0.2%活性碳(activated charcoal (AC), C9157, Sigma-Aldrich)的MS基礎培養基促進芽體高度生長，培養4 wk後，從抽長的叢生芽體頂端切取1.5 cm的單芽進行芽體發根試驗。

1. 試管內(*in vitro*)發根

取接受誘導發根之芽體進行2階段培養共計培養4 wk，第一階段是將芽體移至含有4.92 μM indole-3-butyric acid (IBA, I5386, Sigma-Aldrich)的MS基礎培養基中培養2 wk，第二階段則將培養基中IBA移除再培養2 wk，此時並區分爲二種處理，一爲移至PGR-free(無添加植物生長調節劑)的相同(MS)培養基中持續維持無菌培養(in agar；IA處理)，每一種芽體使用3個蘭花育苗培養盒(直徑95×高105 mm，Type CK-B, 清科企業，臺灣)，每盒接種9個芽體。另一個處理是將芽體移出培養容器，置入未經滅菌的栽培介質(以珍珠石、蛭石、泥炭土同體積混合)中(in planting substrate；IP處理)。介質以三個塑膠方籃容器盛裝，每方籃內移入3種赤桉芽體各9個，上方覆蓋透明壓克力板保持相對濕度，放置在馴化室培養。IA及IP二者皆繼續培養2 wk，讓不定根從芽體基部伸展出來，如此共計培養4 wk後調查發根率、發根量及最長根長(由芽體基部至根尖量測最長根的長度)，試驗重複二次。

2. 試管外(*ex vitro*)發根

將接受誘導發根之芽體移出瓶外，其基部浸泡於0、4.92 × 10^3及9.84 × 10^3 μM之IBA水溶液中1 min後，移入介質中進行發根(EV處理)，其介質組成與方籃容器中芽體之配置同前述IP處理。4 wk後的調查項目亦與前述試管內發根試驗相同，每一處理有3個介質籃，每籃有9個芽體，共計27個芽體，重複二次。

(IV) 植株馴化

將源自不同發根條件及方法之小植株進行馴化，移入盛裝新配製栽培介質的容器中，栽培介質之組成與容器配置亦如同前述IP 處理。移植之小苗先放置於馴化室4 wk後計算其馴化存活率，之後移至溫室再繼續生長4 wk，此時將其各別移入黑色軟盆(直徑9 ×高7.8 cm)，進行成苗培育，並定期測量苗高生長(從栽培介質表面爲基準量至頂芽處)至24 wk時。

(V) 培養條件

三種赤桉組織培養芽體，從增殖到試管內發根階段，皆置於22±1℃之培養室，以冷白螢光燈(cool white fluorescent light)

提供30~35 μmol m^{-2} s^{-1}之光子通量，光週期爲光照16 h/黑暗8 h。試管內發根之IP處理與試管外之發根(EV 處理)，在移入栽培介質的試驗期間以及後續植株馴化培養，都在馴化室內進行，維持相同之光週期但溫度爲24±1℃，並以冷白螢光燈及白熾燈泡(incandescent light)提供28~30 μmol m^{-2} s^{-1}之光子通量。小植株移往溫室培養時，前4 wk持續於方籃內生長，期間隨時間延續逐漸打開上方的壓克力板，以縮小覆蓋面積並增加空隙，於3 wk時完全移除壓克力板，4 wk結束時再將小植株從方籃中各別移入黑色軟盆。

(VI) 統計分析

芽體增殖及發根試驗皆採完全逢機複因子試驗(completely randomized factorial experiment)，在芽體增殖試驗中，檢測培殖體去除頂芽與否以及3種不同來源的赤桉芽體對其增殖有無影響。試管內(IA vs. IP)及試管外(不同IBA浸沾濃度)發根試驗則檢測不同發根處理對3種赤桉芽體發根的影響，並分析三種芽體之反應有無差異。苗高生長試驗採完全逢機設計(completely randomized design)，檢測赤桉及其轉殖系小植株在溫室生長16~24 wk後苗木生長(高度)是否有差異。以上數據使用SPSS 12.0(SPSS, Chicago, IL, USA)套裝軟體進行雙因子或單因子變異數分析(two-way or one-way analysis of variance (ANOVA))，若處理間有顯著差異時再以Tukey's honest significant difference (HSD) test，檢定各處理效應間之差異顯著性 ($p < 0.05$)。發根誘導試驗中之發根率值則先經由角度轉換(arcsine transformation)後再行分析。

Ⅲ、結果

(Ⅰ)多芽體增殖

赤桉及其轉殖系的單一芽體利用2.22 μM BAP及0.27 μM NAA進行增殖後，可誘導出多數叢生狀的側芽，培養至4 wk時，這些叢生芽即以輻射向外生長的方式呈現團聚狀態並將基部的癒傷組織遮蔽(圖1A)。隨著培養時間的增加(4 wk vs. 8 wk)，芽體增殖的數目有增加的趨勢，但赤桉及其二個轉殖系間，有不同結果。轉殖系H204在第4 wk時芽體增殖數目較多

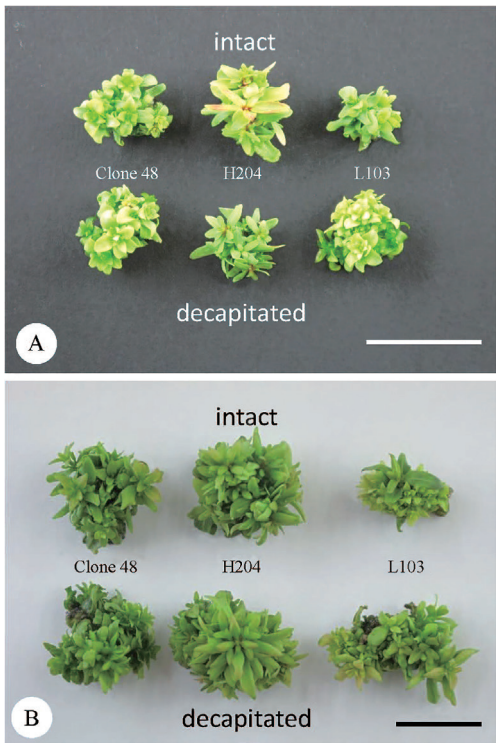

圖1 赤桉及其轉殖系以切除或保留頂芽處理之單一培殖體，在培養4 wk (A)**及**8 wk (B)**後，芽體增殖情形**。Bars = 2.0 cm

Fig. 1 Single shoot explant of Clone 48 and their transgenic lines of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., decapitated or intact, showed multiple shoot proliferation at 4-wk (A) and 8-wk (B) incubations. Bars = 2.0 cm

(表1)，多於其他兩者($p < 0.05$)。但是在第8 wk時，Clone 48及H204轉殖系芽體增殖數目都有增加，單一培殖體可形成50~60個新芽，此時兩者間已無顯著差異(表1)。只有L103轉殖系的增殖芽體數相對較少($p < 0.05$)，且芽體較密集且短小(圖1B)，數目僅有其他兩者之半數(表1)。

除此之外，在第4 wk檢視保留頂芽與否的效果時，初始培殖體保留頂芽使其不受切除頂芽的影響，獲得較多的新芽增生($p < 0.05$)(表1)，其中以H204獲得最多芽體數。而預期中去除頂芽者因解除了頂芽優勢，理應會出現促進側芽增長的效應並沒有發生，因而使其增殖的芽體數目明顯($p < 0.05$)少於保留頂芽者。在增殖到第8 wk時，這種差異則趨向不明顯，有無頂芽其所增殖的芽體數並無差異，且有無頂芽在Clone 48、H204及L103間對芽體之增殖也無交感效應發生(表1)。

(II)芽體發根

表1　轉殖不同木質素生合成調控基因的赤桉組織培養芽體以保留或切除頂芽的方式培養4 wk及8 wk後多芽體增殖的情形

Table 1　Tissue-cultured shoot explants of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. transformed by various lignin biosynthesis regulatory genes, intact or decapitated, showed multiple shoot proliferation at 4-wk and 8-wk incubations

Source factor (Explant type)	Level (transgenic line)	Shoot proliferation (No./explant)[1)]	
		4 wk	8 wk
Shoots (intact)	Clone 48 (control)	9.5 ± 0.7[b]	62.2 ± 6.5[a]
	H204	17.8 ± 1.0[a]	55.1 ± 4.1[a]
	L103	9.9 ± 0.6[b]	25.9 ± 3.9[b]
Shoots (decapitated)	Clone 48 (control)	7.3 ± 0.5[b]	49.8 ± 5.1[a]
	H204	16.7 ± 1.1[a]	53.8 ± 4.8[a]
	L103	8.5 ± 0.8[b]	32.8 ± 3.8[b]
Significance[2)]			
Source factor		Shoot proliferation by 4 wk	Shoot proliferation by 8 wk
Shoots (S) (intact or decapitated)		*	n.s.
Transgenic line (T)		*	*
S × T		n.s.	n.s.

1) Shoot proliferation (mean ± SE) followed by different superscript letters significantly differ as determined by Tukey's honest significant difference (HSD) test at $p < 0.05$.

2) Source factors and their interactive effects on shoot proliferation, where * represents a significant difference detected at $p < 0.05$ by Tukey's HSD test; and n.s. a non-significant difference ($p > 0.05$).

增殖形成的叢生芽體在添加活性碳的培養基中生長4 wk後，芽體抽長高度可達2~6 cm (圖2)，即可切取頂端1.5 cm進行誘導發根。Clone 48及H204叢生芽團中抽長芽體的數目及芽體生長速度均較L103多且快，葉面積也較大。L103的芽團中有接近半數的芽體沒有抽長，其簇生於基部者呈現玻璃質化(hyperhydricity)，無法做爲誘導

圖2 圖示培養容器中皆為赤桉H204芽體，在添加0.2%活性碳的MS培養基中培養4 wk後，經抽長生長，高度達2~6 cm。Bar = 2.0 cm

Fig. 2 Shown in both culture vessels is microshoots of transgenic *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. line H204 incubated for 4 wk on MS medium supplemented with activated charcoal (0.2%) exhibiting shoot elongation up to 2~6 cm. Bar = 2.0 cm

發根之材料。

1. 試管內發根

芽體在試管內接受IBA誘導發根處理時，Clone 48及L103芽體的基部有咖啡色物質累積，使周遭培養基褐化，而H204則無此現象。誘導培養2 wk後繼代並移除IBA，此時基部尚未見膨大的癒傷組織形成。在隨後2 wk的培養階段中，癒傷組織形成，不定根陸續出現，且以H204的芽體於試管內誘導發根(圖3)所需時間最短，於移除IBA之後的第2天即出現不定根。在IBA誘導2 wk之後，仍維持在試管內培養之處理(IA)，其芽體發根之平均根數、最長根長及發根率均顯著優於誘導2 wk後即移入栽培介質馴化(IP)者(表2)，顯示不定根系在形成之初期(1~7天內)，雖然根的延長明顯可見，但仍不耐移出瓶外的環境，需要於培養基中再延長生長的時間到14天時爲佳(即IA處理)。

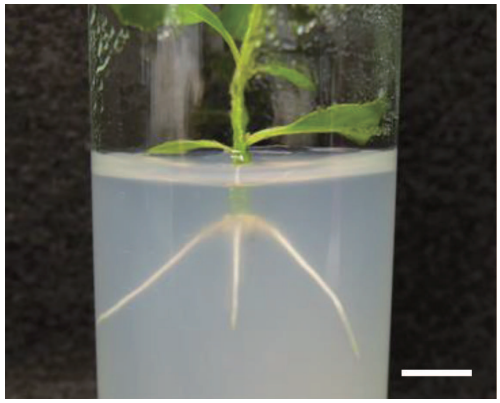

圖3 赤桉H204的芽體經indole-3-butyric acid (IBA)處理後在試管內誘導發根。Bar = 0.5 cm

Fig. 3 Rooting of *in vitro* cultured shoot of transgenic *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. line H204 *via* an indole-3-butyric acid (IBA) stimulation. Bar = 0.5 cm

IA處理的芽體，在試管內培養4 wk後，也移至栽培介質進行馴化(圖4)，並於4 wk後與IP處理之芽體進行比較。小植株中以H204轉殖系存活的情形較佳，但是來自L103轉殖系之發根芽體，因爲生長緩慢，在渡過這個培養環境轉換的馴化期時，不能迅速發展出新葉，會全數死亡(表2)。

圖4 赤桉H204的芽體發根後移入栽培介質進行馴化。

Fig. 4 Rooted microshoots of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. line H204 were transplanted into planting substrate for acclimatization.

表2 比較試管內發根誘導後兩種移植方式對轉基因赤桉芽體發根之影響

Table 2 Comparisons of rooting performance among transgenic *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. shoots receiving *in vitro* rooting treatment followed by removal to agar (IA) or in planting substrate (IP)

Source factor[1)]	Level (transgenic line)	Root No./explant[2)]	Max. root length[2)] (cm)	Rooting (%)[2, 3)]	Survival (%)
IA	Clone 48 (control)	2.3 ± 0.5[a]	0.7 ± 0.2[a]	46.3 ± 12.6[a]	31.1
	H204	1.5 ± 0.5[a]	0.5 ± 0.1[a]	63.0 ± 8.5[a]	49.2
	L103	1.3 ± 0.5[a]	0.7 ± 0.2[a]	20.4 ± 5.3[b]	0.0
IP	Clone 48 (control)	0.7 ± 0.3[b]	0.2 ± 0.1[b]	5.6 ± 2.5[b]	33.3
	H204	1.5 ± 0.4[a]	0.8 ± 0.2[a]	44.4 ± 5.0[a]	88.9
	L103	0.3 ± 0.2[b]	0.2 ± 0.1[b]	3.7 ± 2.3[b]	0.0

Significance[4)]

Source factor	Root No./explant	Max. root length	Rooting (%)
IA vs. IP (I)	*	*	*
Transgenic line (T)	*	*	*
I × T	n.s.	n.s.	n.s.

1) See taxt for treatment definitions, IA: in agar; IP: in planting substrate.

2) Values (mean ± SE) in a same column followed by different superscript letters significantly differ as determined by Tukey's honest significant difference (HSD) test at $p < 0.05$.

3) Percentage data of rooting were subjected to arcsine transformation before analysis.

4) Source factors and their interactive effects on rooting performance, where * represents a significant difference detected at $p < 0.05$ by Tukey's HSD test; and n.s. a non-significant difference ($p > 0.05$).

2. 試管外發根

芽體進行試管外(EV 處理)發根試驗時，未使用IBA誘導處理的對照組，亦能在4 wk後自發性的形成不定根(圖5)，而施用不同濃度之IBA，對發根的各項性狀未造成顯著影響，僅當IBA濃度達9.84 × 10^3 μM時，三種赤桉芽體的發根率下降，惟統計上未達顯著差異(表 3)。在比較三種芽體間的差異時，Clone 48及H204較L103轉殖系之芽體，可形成較多不定根。整體觀察，仍以H204轉殖系芽體的發根表現爲佳，應有利於後續小苗的馴化及生長。

(III)植株馴化

芽體發根後移至栽培介質的馴化過程，其成活率與芽體接受發根誘導的方式有關，本研究觀察到，試管外發根(芽體浸沾IBA後即定植至介質)有助提升成活率。以發根表現較佳之Clone 48及H204芽體爲例，以試管外誘導發根之處理，可使其芽體馴化成活率達100% (表3)。但是在試管內發根者，不論是IA或IP處理，成活率皆不及此(表2)。而觀察發根表現最差之L103芽體，也唯有使用試管外發根方式，才會有小植株通過馴化過程存活，且存活率大於50% (表3)，使用試管內發根者，其芽體馴化時全數死亡(表2)。

馴化後的小植株移至溫室培養，並持續觀察其苗高生長，初期生長4 wk時三種芽體的苗高並無明顯差異(圖6A)，但生長16 wk後，Clone 48與H204苗高已達30 cm，

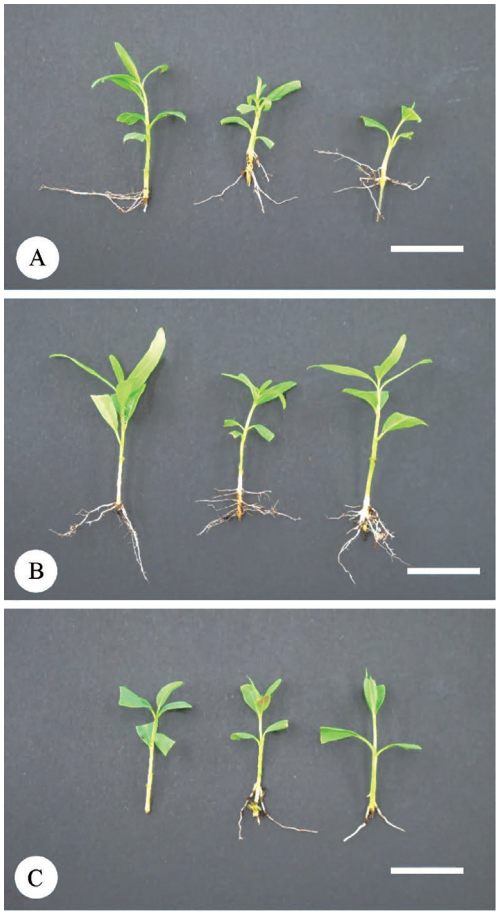

圖5 浸泡不同濃度indole-3-butyric acid (IBA)**(圖中由左而右分別為**0, 4.92×10^3**及** 9.84×10^3 μM**)對赤桉及其轉殖系芽體發根的影響**。(A) Clone 48，(B) H204**及**(C) L103。Bars = 2.0 cm

Fig. 5 Dipping indole-3-butyric acid (IBA) (0, 4.92×10^3, and 9.84×10^3 μM from left to right shown in photos) to promote rooting of Clone 48 and their transgenic lines of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. (A) Clone 48，(B) H204 and (C) L103. Bars = 2.0 cm

而L103小植株生長停頓，苗高僅有3 cm (表4, 圖6B)，隨著生長時間增加到24 wk時，Clone 48及H204之高生長可再增加20~30 cm以上，但L103的生長仍舊相當緩慢，差異明顯可見(表4)。

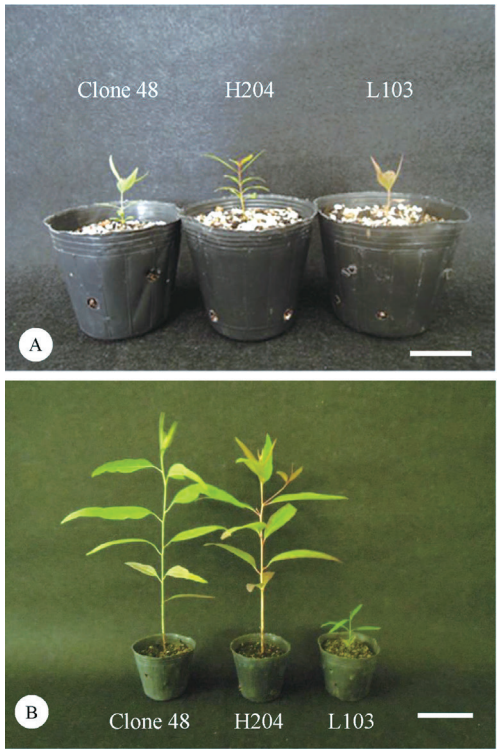

圖6 赤桉及其轉殖系發根之小植株於馴化後移至溫室生長。(A)**生長**4 wk，Bar = 5.0 cm，(B)**生長**16 wk，**小植株高度有明顯的差異**。Bar = 10.0 cm

Fig. 6 Growth performance in rooted plantlets of Clone 48 and their transgenic lines of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. cultivated in a greenhouse after the acclimatization. (A) grown for 4 wk, Bar = 5.0 cm, (B) for 16 wk; showed profound difference in plantlet height. Bar = 10.0 cm

Ⅳ、討論

藉由調控木質素生合成基因來降低細胞壁中木質素的含量，可以在阿拉伯芥(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)的研究中獲得驗證(Lee *et al*., 1997)，這個理論若付諸實際應用，可以是造紙工業改善製漿特性以提高得漿率及降低成本的手段之

表3 比較轉基因赤桉芽體浸泡不同濃度IBA於試管外發根之差異

Table 3 Comparisons of rooting performance among transgenic *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. shoots receiving *ex vitro* IBA dipping treatments

Source factor	Level (transgenic line)	Root No./explant[1)]	Max. root length[1)] (cm)	Rooting (%)[1,2)]	Survival (%)
IBA (μM)	Clone 48 (control)	3.7 ± 0.6[a]	1.8 ± 0.3	37.0 ± 16.1	88.9
0	H204	4.6 ± 1.6[a]	2.3 ± 0.6	77.8 ± 22.2	100
	L103	0.1 ± 0.1[b]	0.3 ± 0.2	25.9 ± 7.4	66.7
	Clone 48 (control)	3.9 ± 1.1[a]	2.1 ± 0.5	37.0 ± 9.8	65.6
4.92×10^3	H204	5.4 ± 2.7[a]	1.7 ± 0.9	40.7 ± 22.5	61.9
	L103	0.7 ± 0.5[b]	0.7 ± 0.5	37.0 ± 22.5	55.6
	Clone 48 (control)	4.8 ± 1.2[a]	2.3 ± 0.5	25.9 ± 7.4	100
9.84×10^3	H204	5.1 ± 2.8[a]	1.8 ± 0.9	37.0 ± 22.5	66.7
	L103	0.6 ± 0.3[b]	1.0 ± 0.6	18.5 ± 13.3	66.7

Significance[3)]

Source factor	Root No./explant	Max. root length	Rooting (%)
IBA (I)	n.s.	n.s.	n.s.
Transgenic line (T)	*	n.s.	n.s.
I × T	n.s.	n.s.	n.s.

1) Values (mean ± SE) in a same column followed by different superscript letters significantly differ as determined by Tukey's honest significant difference (HSD) test at $p < 0.05$.

2) Percentage data of rooting were subjected to arcsine transformation before analysis.

3) Source factors and their interactive effects on rooting performance, where * represents a significant difference detected at $p < 0.05$ by Tukey's HSD test; and n.s. a non-significant difference ($p > 0.05$).

表4 比較赤桉及其轉殖系小植株在溫室馴化後16~24週的苗高生長

Table 4 Comparisons of plantlet height among transgenic *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. rooted shoots acclimated and grown in a greenhouse for 16~24 wk

Transgenic line	Plantlet (n)	Plantlet height (cm)[1)]		
		16 wk	20 wk	24 wk
Clone 48 (control)	24	30.2 ± 1.3[a]	46.7 ± 2.1[b]	50.7 ± 2.6[b]
H204	43	32.6 ± 0.9[a]	55.0 ± 1.5[a]	62.1 ± 1.7[a]
L103	18	3.0 ± 0.4[b]	3.4 ± 0.6[c]	3.8 ± 0.9[c]

1) Values (mean ± SE) in a same column followed by different superscript letters significantly differ as determined by Tukey's honest significant difference (HSD) test at $p < 0.05$.

一。而實際在造林樹種測試其應用的可行性，則有火炬松(*Pinus taeda* L.)(Wei *et al*., 2005)、顫楊(*Populus tremuloides* Michx.)(Hu *et al*., 1999)及多種桉樹(陳振榮等，2001; 鍾振德等，2010)之成功案例。造林木經由基改手段改變遺傳組成之轉殖系，爲求繁殖時能維持其新增的表型性狀，藉由無性繁殖技術來達到此一目標，已是一既定流程，如此才能迅速擴增造林所需之苗木以供大量栽植生產。

桉樹類新植造林所需苗木，大多以扦插法進行無性繁殖，但若發生母樹缺少萌蘖或插穗不易發根等問題，則會出現苗木繁殖的瓶頸。而植物組織培養中微體繁殖技術可以克服前述困難，以相對簡單的步驟及取用最少的材料達到最大量的繁殖。利用微體繁殖做爲多種桉樹苗木的生產技術已有相當多的報告(楊政川等，1996; Gomes and Canhoto, 2003; Arya *et al*., 2009; Aggarwal *et al*., 2012; Brondani *et al*., 2012)。

本研究增殖階段使用BAP搭配NAA可以使芽體數量增加，係參考雜交桉(*E. benthamii* × *dunnii*)芽體增殖的相關研究(Brondani *et al*., 2011)。在多篇發表的報告中亦有使用此種組合的紀錄，皆能有效的增殖芽體(Arya *et al*., 2009; Nazirah *et al*., 2021)。由於獲致相近的效果，本研究中單一培殖體經8 wk培養可增殖超過50個新芽，此種植物生長調節劑的組合應也適用其它桉樹。一般認爲在操作過程中切除頂芽的培殖體因解除了頂芽優勢的抑制作用，應會有較多的側芽產生。但本研究顯示有無保留頂芽在培養8 wk後對新芽的增殖並無影響，可能因赤桉是速生樹種且萌蘖能力強，所以頂芽優勢的效應不顯著。本研究嘗試以不同的流程測試赤桉芽體的發根及馴化反應，經過IBA浸沾之後直接移到介質發根馴化的操作，效果優於先在試管內誘導發根，再移出容器馴化，可能是因爲赤桉形成不定根的能力甚強，直接進行試管外發根的操作僅移植一次，且在尚沒有根系形成的階段進行，減少了小植株可能受到的傷害。

本研究除了嘗試優化微體繁殖的操作條件之外，在整個操作過程中也觀察到不同的轉殖系中，各階段生長情形有極大差異。基改植物在目標性狀被人爲植入後，除了要能穩定表現這個修改後的性狀之外，植物育成及田間栽培後的整體生長表現，也是決定基改植物是否具有產業應用價值的關鍵之一。以農作物爲例，有案例顯示爲了提高飼料的轉化率及減低磷污染，將水稻(*Oryza sativa* L.)及馬鈴薯(*Solanum tuberosum* L.)轉殖植酸酵素基因(phytase gene)後，其農藝性狀(株高、分蘖數、抽穗期、主莖長、側枝數、地上部乾重等植株生長性狀)及單位產量會下降(陳烈夫等，2007；曾清山等，2008)，這種情形若是嚴重者，該基改作物應該會失去繼續種植的價值。

本研究觀察到3種赤桉芽體中，以轉殖順義式*PtCAld5H*基因的H204轉殖系，在芽體增殖、誘導發根、馴化及苗高生長等生理性狀皆有較佳的表現，顯示提高木質素單體S/G的比例，不影響本研究中赤桉的生長，甚至在組織培養操作階段，即開始出現正向的促進效果。但轉殖反義式*Euc4CL1*基因的L103轉殖系，在各培養階段的反應卻非如此，於相同組織培養的環境條件下已經有生長不佳的缺點出現，尤其是在溫室中培養24 wk後，其高生長明顯低於Clone 48及H204 (表4)。極爲緩慢的生長速度使這個轉殖系增殖所得之苗木，不可能作爲以造紙爲目地的育林材料，因爲生長緩慢及低矮的外型，無法提供足夠之立木材積做爲造紙原料，造林無法獲利。

L103轉殖系基改的學理基礎，在於干

擾其*Euc4CL1*基因之轉譯作用，降低其木質素生合成酵素之含量，使木質素合成量減少。顯然木質素含量降低之後，會嚴重影響本研究中赤桉的常態生長。在基改的雜交白楊(*Po. tremula* × *alba*)中，同樣轉殖反義式*4CL* 基因者雖然有效的降低細胞壁中木質素含量，但2年生的轉殖系苗木其地上部生物量減少，出現棕色的木材，植株生長遲緩且多分枝如灌木狀，後續生長受到抑制(Voelker *et al*., 2010; 2011)。在另一種基改雜交白楊(*Po. deltoides* × *euramericana* cv. “Nanlin895”)所做的進一步研究顯示，轉殖反義式*4CL*基因時，若是轉入使木質素生合成受抑制的現象僅發生在導管(vessel-specific suppression)的*V-4CL-A*基因，則會使被轉殖者導管變形，嚴重影響水分長途運輸的功能，使其田間生長不良。植株高生長雖在8 wk時與野生型無差異，但在生長1年之後就明顯矮於野生型(Cao *et al*., 2020)。

在放射松(*Pi. radiata* D. Don)的研究則顯示，同樣轉殖反義式*4CL*基因的基改苗木，植株生長也受抑制，植株低矮分枝有如盆景中之植物。其樹皮組織增多且含類黃酮(flavonoid)或單寧類(tannins)化合物。負責運輸水份的管胞塌陷，作者認爲是導致樹種生長遲緩的重要因素(Wagner *et al*., 2009)。但是同樣轉殖這個反義基因者，也有報告顯示其生長優於未轉殖的對照組，例如在顫楊的例子，木質素含量降低的苗木在生長10 wk後，其苗高生長優於對照組，具較粗壯的莖、較長之節間以及較大的葉片(Hu *et al*., 1999)。

基改的植物除了要追蹤轉殖的基因是否穩定表現，使植物呈現新的遺傳性狀，也需要瞭解這種遺傳上的改變是否影響其它既有的表型。若如本研究之例子，L103轉殖系在生長發育上出現巨幅的變化，可能使其失去經濟價值，則須盡早發現而將之剔除，因此早期監測基改苗木的生長具有重要性。以反義式的*4CL*基因爲例，由於相同的基因轉殖操作，影響植物後續常態生長竟然有正反兩極之差異，這項監測生長的工作更是必須。本研究所得之數據顯示，植物在基因轉殖之後，於組織培養繁殖階段，即可進行觀察及汰選，可在進入苗圃育苗或田間生長試驗前，先期了解基改植物是否還適合商業規模之栽植，或可省去部分檢驗步驟及經費的支出。

Ⅴ、結論

本研究探討轉殖不同基因的赤桉，在木質素生合成受到調控之後，於優化組織培養繁殖各階段的過程中，其生長表現好壞之差異。經優化的培養條件，可使赤桉芽體以BAP搭配NAA進行增殖，再經活性碳培養至1.5 cm的長度後，可在試管外誘導發根同時進行馴化，僅需16 wk即可獲得苗木於苗圃培養，可爲快速繁殖赤桉造林材料之方法。在此過程中，以轉殖順義式*PtCAld5H*基因的H204轉殖系表現最佳，在增殖、發根、馴化及苗高生長都優於沒有轉殖基因的Clone 48 (對照組)，而轉殖反義式*Euc4CL1*基因的L103轉殖系在進行相同比較時，各項生長反應皆差。此結果可利用在苗圃培育及田間生長試驗前，更早期篩選轉殖系是否適合推廣爲商業化栽植之

造林材料。

Ⅵ、致謝

本研究承蒙林業試驗所育林組鍾振德博士提供研究材料，謹此致謝。

Ⅶ、引用文獻

陳振榮、張淑華、何政坤、陳怡蒨、蔡佳彬、姜立泉 (2001) 轉殖外源顫楊C4H基因之赤桉苗木生產。台灣林業科學 16(4):249-258。

陳烈夫、曾文彬、魏夢麗、呂秀英 (2007) 植酸酵素基因轉殖之馬鈴薯植株生長和產量評估。台灣農業研究 56(1) : 45-52。

曾清山、吳明哲、黃鴻章、賴明信、陳治官 (2008) 轉殖植酸酵素基因水稻之農藝性狀及田間生物安全性評估。台灣農業研究 57(3):175-182。

楊政川、何政坤、張淑華、陳振榮 (1996) 速生表型赤桉成熟樹之微體繁殖。台灣林業科學 11(4): 421-431。

鍾振德、陳怡蒨、魏濟昀、石鳳嬌、陳振榮、許原瑞、蔡佳彬 (2010) 基因轉殖桉樹不同組合後裔之表現。林業研究專訊 17(6) : 62-64。

Aggarwal, D., A. Kumar, J. Sharma and M. S. Reddy (2012) Factors affecting micropropagation and acclimatization of an elite clone of *Eucalyptus tereticornis* Sm.. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant 48: 521-529.

Arya, I. D., S. Sharma and S. Arya (2009) Micropropagation of superior eucalyptus hybrids FRI-5 (*Eucalyptus camaldulensis* Dehn × *E. tereticornis* Sm) and FRI-14 (*Eucalyptus torelliana* F.V. Muell × *E. citriodora* Hook): a commercial multiplication and field evaluation. African Journal of Biotechnology 8(21): 5718-5726.

Brondani, G. E., H. W. de Wit Ondas, F. J. B. Baccarin, A. N. Goncalves and M. de Almeida (2012) Micropropagation of *Eucalyptus benthamii* to form a clonal micro-garden. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant 48: 478-487.

Brondani, G. E., L. F. Dutra, I. Wendling, F. Grossi, F. A. Hansel and M. A. Araujo (2011) Micropropagation of an *Eucalyptus* hybrid (*Eucalyptus benthamii* × *Eucalyptus dunnii*). Acta Scientiarum Agronomy 33(4): 655-663.

Cao, S. M., C. Huang, L. F. Luo, S. Zheng, Y. Zhong, J. Y. Sun, J. S. Gui and L. G. Li (2020) Cell-specific suppression of 4-Coumarate-CoA ligase gene reveals differential effect of lignin on cell physiological function in *Populus*. Frontiers in Plant Science 11: 1-11.

Gomes, F. and J. M. Canhoto (2003) Micropropagation of *Eucalyptus nitens* Maiden (shining gum). *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant 39: 316-321.

Hu, W. J., S. A. Harding, J. Lung, J. L. Popko, J. Ralph, D. D. Stokke, C. J. Tsai and V. L. Chiang (1999) Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose

accumulation and growth in transgenic trees. Nature Biotechnology 17: 808-812.

Jia, C. H., H. Y. Zhao, H. Z. Wang, Z. F. Xing, K. J. Du, Y. R. Song and J. H. Wei (2004) Obtaining the transgenic poplars with low lignin content through down-regulation of *4CL*. Chinese Science Bulletin 49(9): 905-909.

Lee, D., K. Meyer, C. Chapple and C. J. Douglas (1997) Antisense suppression of 4-coumarate: coenzyme A ligase activity in Arabidopsis leads to altered lignin subunit composition. Plant Cell 9(11): 1985-1998.

Li, L. G., Y. H. Zhou, X. F. Cheng, J. Y. Sun, J. M. Marita, J. Ralph and V. L. Chiang (2003) Combinatorial modification of multiple lignin traits in trees though multigene cotrasformation. Proceedings of the National Academy of Sciences 100(8): 4939-4944.

Murashige, T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

Nazirah, A., H. Nor-Hasnida, A. W. Mohd-Saifuldullah, Y. Muhammad-Fuad, Y. Ahmad-Zuhaidi and K. Rozidah (2021) Development of an efficient micropropagation protocol for eucalyptus hybrid (*E. urophylla* × *E. grandis*) through axillary shoot proliferation. Journal of Tropical Forest Science 33(4): 391-397.

Voelker, S. L., B. Lachenbruch, F. C. Meinzer, M. Jourdes, C. Ki, A. M. Patten, L. B. Davin, N. G. Lewis, G. A. Tuskan, L. Gunter, S. R. Decker, M. J. Selig, R. Sykes, M. E. Himmel, P. Kitin, O. Shevchenko and S. H. Strauss (2010) Antisense down-regulation of 4CL expression alters lignification, tree growth and saccharification potential of field-grown poplar. Plant Physiology 154(2): 874-886.

Voelker, S. L., B. Lachenbruch, F. C. Meinzer and S. H. Strauss (2011) Reduced wood stiffness and strength, and altered stem form, in young antisense 4CL transgenic poplars with reduced lignin contents. New Phytologist 189(4): 1096-1109.

Wagner, A., L. Donaldson, H. Kim, L. Phillips, H. Flint, D. Steward, K. Torr, G. Koch, U. Schmitt and J. Ralph (2009) Suppression of 4-Coumarate-CoA ligase in the coniferous gymnosperm *Pinus radiata*. Plant Physiology 149(1): 370-383.

Wei, T., A. Nelson and E. Johnson (2005) Increasing cellulose production and transgenic plant growth in forest tree species. Journal of Forestry Research 16(1): 67-72.