

溶菌酶 (lysozyme) 與抗菌胜肽 (Cecropin) 基因轉殖至 蝴蝶蘭葉綠體之研究

傅承泰¹⁾ 潘怡君²⁾ 曾夢蛟³⁾

關鍵字：蝴蝶蘭、葉綠體基因轉殖、溶菌酶、抗菌胜肽

摘要：本研究之目的為：1. 建立蝴蝶蘭之葉綠體基因轉殖系統，2. 探討利用葉綠體基因轉殖系統，轉殖溶菌酶 (lysozyme, *lys*) 與抗菌胜肽 (cecropin, *cecA*) 基因到蝴蝶蘭葉綠體，培育出抗病之蝴蝶蘭的可行性。以基因槍法將所構築之攜帶 *lys* 及 *cecA* 基因之蝴蝶蘭葉綠體基因轉殖載體轟擊到蝴蝶蘭的培植體 (protocorm like body, PLB)。以 Spectinomycin 篩選轉殖培植體並誘導再生成蝴蝶蘭植株。轉殖再生植株葉片之 PCR 及 RT-PCR 分析之結果顯示，轉殖之 *lys* 及 *cecA* 基因已存在於轉殖蝴蝶之葉綠體基因組，並表現其 mRNA。

前 言

台灣的蝴蝶蘭產業在台灣及國際上的花卉產業中佔重要的地位。台灣蝴蝶蘭多栽培於溫室中，溫暖潮濕的環境很適合細菌及真菌的生長，一旦管理不善，全面蔓延，影響蘭花品質甚鉅，病害的防治為產業永續發展的關鍵問題。目前台灣蝴蝶蘭的主要細菌性病害為軟腐病、褐斑病及葉斑病；真菌病害為疫病、灰黴病 (花瓣灰斑病)、白絹病、炭疽病、葉黃病及基腐病等 (謝，2004)。以生物技術改善蝴蝶蘭產業生產上最主要的產品品質不穩定及規格良莠不齊等問題，將可穩定蝴蝶蘭產品的商業化，開創台灣蘭花事業永續經營的新契機。

抗細菌性病原菌之植物抗病育種研究，目前是所有抗病研究中進展最緩慢，運用生物技術將可加速抗病作物品種之育成，以減少化學農藥對環境、生態、人類健康之危

-
- 1) 國立中興大學園藝學系博士班研究生。
 - 2) 國立中興大學園藝系副教授。
 - 3) 國立中興大學園藝學系教授，通訊作者。

害。溶菌酶 (lysozyme, *lys*) 可以使細菌細胞壁中的肽聚醣網狀結構崩解，破壞細菌的細胞壁導致細菌死亡 (Loessner, 2005)。而抗菌肽 (cecropin, *cecA*) 可在脂雙層膜上形成陰離子選擇性通道殺死病原菌，對細菌、真菌、病毒等均具有強力的殺傷作用 (吳, 2012; 陳, 2005; Lee *et al.*, 2011)。

植物葉綠體基因轉殖有以下優點：1. 葉綠體轉殖基因表現量高於核轉殖、2. 葉綠體基因組為母系遺傳不會基因漂流、3. 目前沒有報告指出有基因沉默和插入位置效應的問題 (Sinagawa-García, 2009)。基於以上優點建立葉綠體基因轉殖技術是現代生物技術研究的重要方向 (Ahmad *et al.*, 2016)。但蘭花葉綠體基因轉殖技術則尚未有報導。

本研究目標是轉殖溶菌酶 (lysozyme, *lys*) 及抗菌肽 (*cecropin*, *cec*) 基因到蝴蝶蘭的葉綠體。本研究所轉殖之溶菌酶基因是由中興大學分生所楊明德老師之研究室自 *Xanthomonas fragariae* (草莓角斑病菌) 菌株的類似噬菌體 (phage XF) 尾部細菌素的基因組 (phage tail-like bacteriocin) 中所分離獲得的 (廖, 2006)。發現對十字花科黑腐病菌、水稻白葉枯病菌和柑桔潰瘍病菌等具有強烈抑菌。楊明德老師之研究室同時以 PCR 合成蒼蠅 (*Musca domestica*) *cecropin* (抗菌肽, Antimicrobial peptide) 基因，且將 *cecropin* 與 *lys* 基因增幅成 *cecropin/lys* 基因，所形成之融合蛋白更能提升兩種蛋白之相對殺菌活性。

本研究將 *cecropin*、*lys* 基因構築成蝴蝶蘭葉綠體基因轉殖載體，使用基因槍轉殖法轉殖 *cecropin* 及 *lys* 基因到蝴蝶蘭葉綠體，期望獲得更能抗多種病害之蝴蝶蘭。本研究目的為建立蝴蝶蘭之葉綠體基因轉殖系統，並且探討以葉綠體基因轉殖開發抗病之蝴蝶蘭的可行性。

材料與方法

一、供試材料

(一)、基因轉殖之植物材料

本試驗使用植物材料為台灣白花蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana*) 之的培植體 (protocorm like body, PLB)，作為葉綠體基因轉殖之植物材料。

(二)、轉殖之基因與載體

本試驗轉殖之溶菌酶基因 (Lysozyme, *lys*) 及天蠶素基因 (Cecropin, *cecA*) 是由楊明德教授實驗室提供。載體為：1. pMT93t-GLCa-A：攜帶 *lys*、*cecA*、*aada*、*gus* 等基因，以 *trnI/trnA* 為基因重組位置 (圖 1A)；2. pMT93t1-GLCa-A：攜帶 *lys*、*cecA*、*aada*、*gus* 等基因，以 *trnV/3'rps12* 為基因重組位置 (圖 1A)，為本研究室自行構築之載體 (傅等, 2020)。

二、試驗方法

(一)、蝴蝶蘭 PLB 之基因槍轟擊與再生

1. 基因槍轟擊

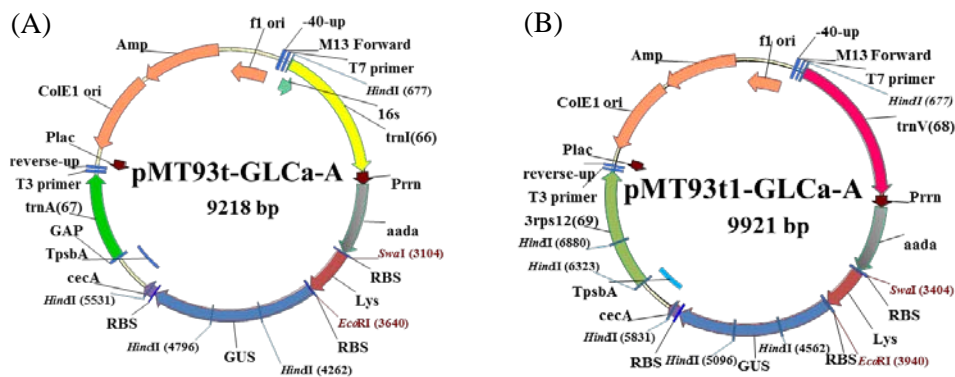


圖 1. 葉綠體轉殖載體 pMT93t-GLCa-A (A)與 pMT93t1-GLCa-A (B)之限制酵素圖譜。

Fig.1. Restriction enzyme maps of transplastomic vectors pMT93t-GCa-A (A) and pMT93t1-GCa-A (B).

(1) 金粉備置

準備 50 mg 金粉裝入離心管中。加入 1.5 mL 70% 酒精。以最高速震盪 5 分鐘。放置室溫 15 分鐘。離心 600 g，1 分鐘後去除上清液。以下重覆三次，加入 1.5 mL 無菌水，最高速震盪 1 分鐘，放置室溫 1 分鐘，離心 600 g，1 分鐘後去除上清液。加入 834 μ L 50% 甘油。以最高速震盪 5 分鐘。震盪的情況下分裝每管 50 μ L 共 17 管，金粉溶液之濃度為 60 mg/mL。存放於 -20°C。

(2) 金粉與轉殖載體 coating 流程

將轉殖載體取 2.5 μ L 的 1 μ g/ μ L pMT93t-GLCa-A 與 pMT93t1-GLCa-A (圖 1) 混合，取其 5 μ L 加入 50 μ L 的 60 mg/mL 金粉溶液中，加入 50 μ L 2.5M CaCl₂，20 μ L 0.1M spermidine，以上流程都在持續的震盪。將金粉混合液持續的震盪 3 分鐘。震盪完成後室溫放 1 分鐘。離心 600 g，10 秒後去除上清液。加入 140 μ L 70% 酒精清洗並去除上清液。加入 140 μ L 99.9% 無水酒精洗滌並去除上清液。加入 48 μ L 99.9% 無水酒精並震盪懸浮 pellet。持續的震盪吸取 7.5 μ L 塗在微載片上，總共可塗 5 次。將微載片放置在低溼度的環境下吹乾即可進行基因槍轟擊。

(3) 基因槍轟擊

使用 PDS-1000/He 基因槍 (Bio-Rad)，將攜帶 DNA 的金粒子轟擊入蝴蝶蘭 PLB 之細胞中。

(4) 蝴蝶蘭之 PLB 誘導、基因槍轉殖、篩選及誘導再生植株之情形

首先將 PLB 切成小塊或對半切誘導 PLB 產生約一個月，轟擊前一週 PLB 切成小塊或對半切後放置 T2 培養基癒傷，PLB 置於培養皿中心 (2 cm)，進行基因槍轟擊，PLB 的殖體頂端與尾部各轟擊 1 次。以不同的條件進行轟擊距離 6、9 或 12 公分。轟擊壓力 900

或 1,100 psi。真空度為 28Hg/in。

轟擊後，PLB 以含 25、50、100 或 200 ppm Spectinomycin 的 T2 再生培養基 (0.35% Hyponex No.1<花寶一號>，0.1% Tryptone，0.01% Citric acid，2% Sucrose，2% Sweet potato，2.5% Banana，pH 5.5，0.1% Charcoal，0.3% Phytigel) 進行篩選再生 (3~12 個月)。

(二)、蝴蝶蘭葉綠體擬轉殖株分析

1. 植物總 DNA 萃取

取 0.1 g 之葉片以 Plant Genomic DNA Purification Kit DP022 萃取總 DNA。

2. PCR

本試驗使用 KAPA3G Plant PCR Kit (KAPA Biosystems) 進行 PCR。Lysozyme 基因 PCR：依序加入 12.5 μ L 2X KAPA Plant PCR Buffer、X μ L ddH₂O、0.75 μ L Forward Primer: Lyso 444bp-R 5'- ATGAGCCAGACCGCTAAA -3'、0.75 μ L Reverse Primer: Lyso 444bp-F 5'- GGTGCCTTTGACATATACCC -3'、0.2 μ L 2.5 U/ μ L KAPA3G Plant DNA Polymerase 與 1 μ L DNA (原液稀釋 20 倍)，混合後總體積 25 μ L，以熱循環：95°C、3 分鐘，1 個循環；95°C、20 秒，55°C、15 秒，72°C、15 秒，35 個循環；72°C、30 秒，1 個循環進行增幅。Cecropin A 基因 PCR：依序 12.5 μ L 2X KAPA Plant PCR Buffer、X μ L ddH₂O、0.75 μ L Forward Primer: 21-SmaI-*cecA*-GGAGG 5'- GATTCTCCCGGG GGGAGGGATTTATGGG CTGGCTGAAAAAATCGGC A -3'、0.75 μ L Reverse Primer: Cecropin-R 5'- TCAACCCTT T AAT GTAGCG GCA -3'、0.2 μ L 2.5 U/ μ L KAPA3G Plant DNA Polymerase 與 1 μ L DNA (原液稀釋 20 倍)，混合後總體積 25 μ L，以熱循環：95°C、3 分鐘，1 個循環；95°C、20 秒，55°C、15 秒，72°C、15 秒，35 個循環；72°C、30 秒，1 個循環進行增幅。獲得的產物以 1% agarose gel 分離後使用 ETBR 染色並照相。

3. 總 RNA 萃取

本試驗使用 TRIzol (Invitrogen) 藥劑進行植株總 RNA 萃取。將蝴蝶蘭葉片或根樣本秤重約 100 mg。研鉢中加入液態氮將樣本磨細，將粉末加入離心管再加入 1 mL TRIzol 藥劑。將樣本裝入離心管，以 4°C 離心 12,000 g，5 分鐘。取上清液到新的離心管加入 0.2 mL chloroform 搖晃後放置室溫 3 分鐘。4°C 離心 12,000 g，15 分鐘。取上層液體到新的離心管加入等體積 isopropanol 室溫放置 10 分鐘。4°C 離心 12,000 g，10 分鐘。去除上清液。加入 1 mL 75% 酒精。以 vortex 懸浮 pellet。4°C 離心 7,500 g，5 分鐘。去除上清液。將 pellet air dry 10 分鐘。依據 pellet 不同大小加入 20~50 μ L nuclease free water (Fermentas) 回溶 RNA。放入 55~60°C 水浴鍋 10~15 分鐘。將已回溶的 RNA 放入 -80°C 保存。

4. RNA 反轉錄 cDNA

本試驗使用 ReverTra Ace Set (PU-TRT-100) 進行 RNA 反轉錄。將 4 μ L 5x RT Buffer、2 μ L dNTP Mixture、0.25 μ L RNase Inhibitor、1 μ L Sequence specific downstream primer (10 pmol/ μ L)、X μ L RNase Free H₂O、1 μ L ReverTra Ace 和 0.5 μ g RNA 混合後總體積 20 μ L。以熱循環：42°C、20 min；99°C、5 min。將 cDNA 放入 -80°C 保存。

5. RT-PCR

本試驗使用 KAPA3G Plant PCR Kit (KAPA Biosystems) 進行 RT-PCR。Lysozyme 基因 RT-PCR：依序加入 12.5 μL 2X KAPA Plant PCR Buffer、X μL ddH₂O、0.75 μL Forward Primer：Lyso 444bp-R 5'- ATGAGCCAGACCGCTAA A -3'、0.75 μL Reverse Primer: Lyso 444bp-F 5'- GGTGCCTTTGACATATACC C -3'、0.2 μL 2.5 U/ μL KAPA3G Plant DNA Polymerase 與 1 μL cDNA，混合後總體積 25 μL ，以熱循環：95°C、3 分鐘，1 個循環；95°C、20 秒，55°C、15 秒，72°C、15 秒，35 個循環；72°C、30 秒，1 個循環進行增幅。Cecropin A 基因 RT-PCR: 依序加入 12.5 μL 2X KAPA Plant PCR Buffer、X μL ddH₂O、0.75 μL Forward Primer: 21-SmaI-*cecA*-GGAGG 5'- GATTCTCCCGGGGGGA GGGATTTA TGGGCTGGCTGAAAAAATCGGCA -3'、0.75 μL Reverse Primer: Cecropin-R 5'- TCAAC CCTTTAATGTAGCGGCA -3'、0.2 μL 2.5 U/ μL KAPA3G Plant DNA Polymerase 與 1 μL cDNA，混合後總體積 25 μL ，以熱循環：95°C、3 分鐘，1 個循環；95°C、20 秒，55°C、15 秒，72°C、35 秒，35 個循環；72°C、30 秒，1 個循環進行增幅。獲得的產物以 1% agarose gel 分離後使用 ETBR 染色並照相。

結 果

一、蝴蝶蘭之 PLB 誘導、基因槍轉殖、篩選及誘導再生植株之情形

首先將台灣白花蝴蝶蘭之 PLB 切成小塊或對半切誘導 PLB 產生，約一個月後做為轟擊材料 (圖 2A)。轟擊前一週將切成小塊或對半切後放置 T2 培養基癒傷 (圖 2B)，PLB 置於培養皿中心 (2 cm)，進行基因槍轟擊 (圖 2C)。轟擊後，以含 25 (圖 2D)、50 (圖 2E)、100 (圖 2F) 或 200 ppm Spectinomycin (圖 2G) 的 T2 再生培養基進行篩選 (3 個月)。篩選期間未轉殖 PLB 白化死亡。持續篩選 6~12 個月可獲得蝴蝶蘭綠色擬轉殖株 (圖 2H)。

二、PCR 分析蝴蝶蘭擬轉殖株

以擬轉殖蝴蝶蘭的 DNA 為模板，使用引子 Lyso 444bp-R、Lyso 444bp-F 進行 PCR 反應，在編號 1、4、8、10 和 17 的轉殖株能增幅出 0.44 kb 的 *lys* 基因片段 (圖 3)，顯示 *lys* 基因已成功轉殖到蝴蝶蘭葉綠體基因組上。以擬轉殖蝴蝶蘭的 DNA 為模板，使用引子 21-SmaI-*cecA*-GGAGG、Cecropin-R 進行 PCR 反應，在編號 2、3、8、14、21 和 22 能增幅出 0.15 kb 的 *cecA* 基因片段 (圖 3)，顯示 *cecA* 基因已成功轉殖到蝴蝶蘭葉綠體基因組上。

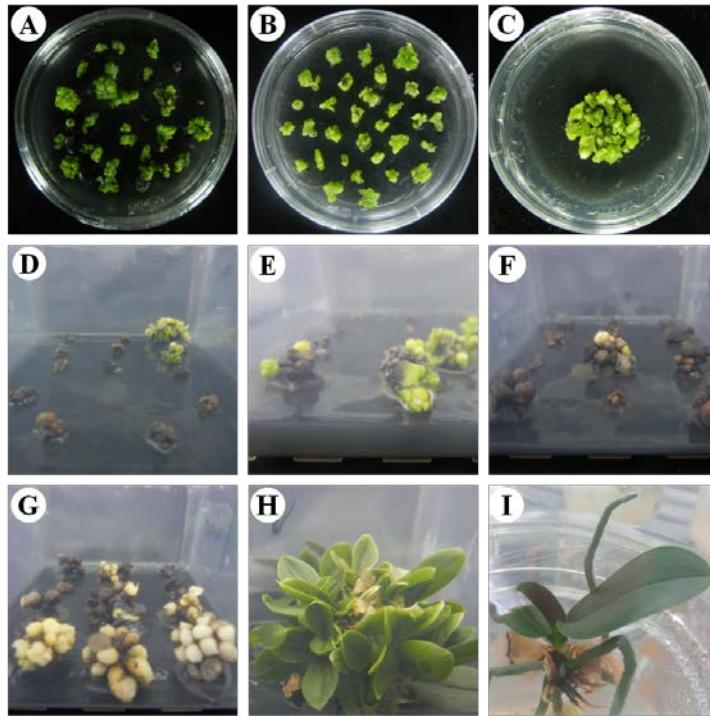


圖 2. 台灣白花蝴蝶蘭之 PLB 誘導、基因槍轉殖、篩選及誘導再生植株之情形。(A)PLB 誘導；(B)轟擊前 PLB 癒傷一週；(C)PLB 置於培養皿中心 (2 cm)，進行基因槍轟擊；(D)~(G)轟擊後，以含 25 (D)、50 (E)、100 (F)或 200 ppm Spectinomycin (G)的再生培養基進行篩選 (3 個月)；(H)(I)獲得蝴蝶蘭擬轉植株 (6 個月~24 個月)。

Fig. 2. Regeneration of transplastomic *P. aphrodite* subsp. *formosana* from PLBs. (A)Induction of PLBs. (B)PLBs were cut into small pieces then cultivated in regeneration medium 1 week before bombardment. (C)PLBs were placed in the circle within a 2.5 cm radius for gene gun bombardment. (D~G)After bombardment, PLBs were placed in regeneration medium supplied with 25 (D), 50 (E), 100 (F), and 200 ppm (G)spectinomycin (3 month). (H~I)Appearances of putative transplastomic *Phalaenopsis* plantlets (H)and shoots (I)after 6 month (H)and 24 month of cultivation, respectively.

三、RT-PCR 分析蝴蝶蘭擬轉植株

以擬轉殖蝴蝶蘭的 cDNA 為模板，使用引子 Lyso 444bp-R、Lyso 444bp-F 進行 RT-PCR 反應，在編號 1、4 和 22 能增幅出 0.44 kb 的 *lys* 基因片段 (圖 4)，證明 *lys* 基因已成功轉殖到蝴蝶蘭葉綠體基因組上並表現其 mRNA。

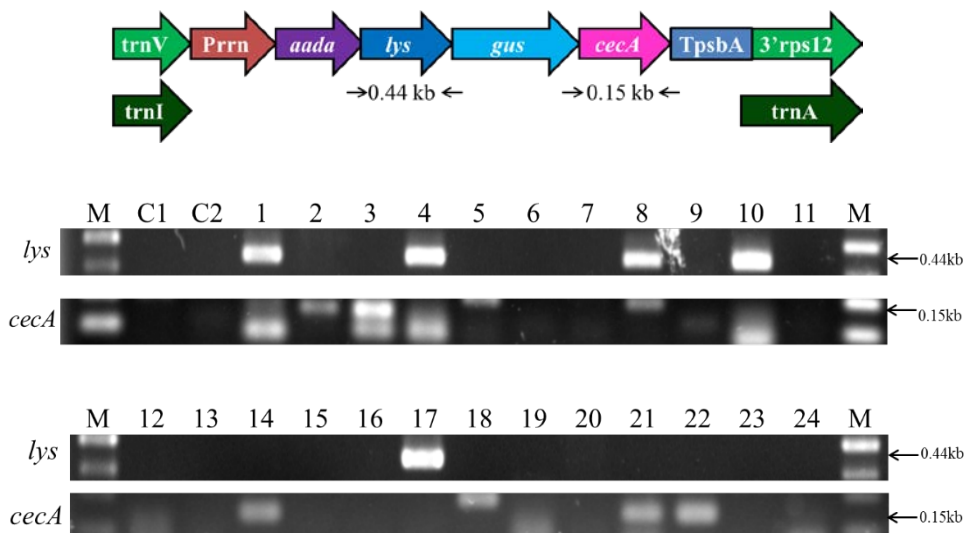


圖 3.以葉綠體基因擬轉殖台灣白花蝴蝶蘭之基因組 DNA 為模版，使用引子 Lyso 444bp-R/Lyso 444bp-F 或 21-SmaI-*cecA*-GGAGG/ Cecropin-R 進行 PCR 偵測目標基因 *lys* 或 *cecA*。M:DNA ladder。C1:台灣白花蝴蝶蘭未轉殖株。C2:姬蝴蝶蘭未轉殖株。1~24: 葉綠體基因轉殖台灣白花蝴蝶蘭擬轉殖株。

Fig. 3. Identification of *lys* and *cecA* genes in putative transplastomic *P. aphrodite* subsp. *formosana* by PCR. M: DNA ladder ; C1: untransformed *P. aphrodite* subsp. *formosana*; C2: untransformed *P. equestris*); 1~24: putative transplastomic *P. aphrodite* subsp. *formosana*.

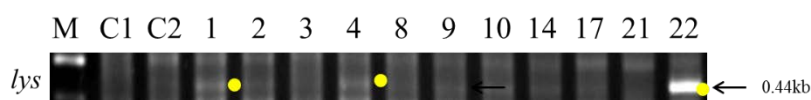


圖 4. RT-PCR 偵測葉綠體基因轉殖蝴蝶蘭目標基因 *lys* 之表現情形。M：DNA ladder。C1：台灣白花蝴蝶蘭未轉殖株。C2：姬蝴蝶蘭未轉殖株。1~22：葉綠體基因轉殖蝴蝶蘭擬轉殖株。

Fig. 4. Identification of *lys* mRNA in putative transplastomic *P. aphrodite* subsp. *formosana* by RT-PCR. M: DNA ladder ; C1: untransformed *P. aphrodite* subsp. *formosana*; C2: untransformed *P. equestris*); 1~22: putative transplastomic *P. aphrodite* subsp. *formosana*.

討 論

一、蝴蝶蘭之 PLB 誘導、基因槍轉殖、篩選及誘導再生植株

PLB 切成小塊或對半切誘導 PLB 產生約一個月，轟擊前一週將切成小塊或對半切後放置 T2 培養基癒傷，再將 PLB 置於培養皿中心。由於誘導出來的 PLB 是由母株 PLB 的圓球表面分化，所以基因槍轟擊 PLB 的正反兩面期待轟擊到更多的圓球表面。轟擊後，以含 25、50、100 或 200 ppm Spectinomycin 的 T2 再生培養基進行篩選，以 25、50 ppm Spectinomycin 篩選期間 PLB 白化較不明顯大多是褐化死亡。但以 100 或 200 ppm Spectinomycin 篩選 PLB 白化明顯，所以此濃度可能是較適合的篩選濃度。持續篩選 6~12 個月可獲得蝴蝶蘭綠色擬轉殖株，但大多植株都有汙染不明的細菌或真菌，所以為了拯救植株將其移到沒有 Spectinomycin 的培養基，此期間汙染的細菌或真菌依然生長有些植株也被影響死亡。因為獲得的植株未進行同質化的處理如果移除篩選藥劑可能導致轉殖成功的葉綠體漸漸變少。由於轉殖之目標基因 *cecA* 和 *lys* 都是抗菌基因所以汙染的細菌或真菌也可能作為一種篩選壓力，期望轉殖成功的葉綠體能夠比未轉殖的葉綠體有更好的生長優勢。

二、蝴蝶蘭葉綠體擬轉殖株分析

經過 Spectinomycin 和細菌或真菌的篩選獲得 24 株蝴蝶蘭葉綠體擬轉殖株。萃取葉片或根之基因組 DNA 進行 PCR 分析，擬轉殖株編號 1、4、8、10 和 17 能增幅出 *lys* 基因，證明 *lys* 基因已成功轉殖到蝴蝶蘭葉綠體基因組上。擬轉殖株編號 2、3、9、14、21 和 22 能增幅出 *cecA* 基因，證明 *cecA* 基因已成功轉殖到蝴蝶蘭葉綠體基因組上。比較特別的是基因槍轟擊使用的轉殖載體是帶有 *cecA* 和 *lys*，但是擬轉殖株都只能各別偵測到其中一個目標基因。推測有可能是 DNA 同源重組的現象發生，因為 *cecA* 和 *lys* 基因都是以同樣 RBS 序列約 14 bp，產生短的順向重複 (short direct repeats) 序列可能誘發同源重組導致序列缺失。雖然前人研究發現順向重複 (short direct repeats) 序列在 400 bp 以上有較高的誘發同源重組的機率，但在小麥葉綠體也有觀察到短的順向重複 (short direct repeats) 序列 5~9 bp 的長度的兩段序列就可能是引發小麥葉綠體基因組序列缺失的原因 (Ogihara *et al.*, 1988)。所以設計葉綠體轉殖載體應避免存在順向重複序列。進一步將擬轉殖株編號 1、2、3、4、8、9、10、14、17、21 和 22 萃取總 RNA 偵測 *cecA* 和 *lys* 基因表現情形，結果顯示擬轉殖株編號 1、4 和 22 能偵測到 *lys* 基因表現。但不是所有在 PCR 偵測到 *lys* 基因的植株都能在 RT-PCR 偵測到 mRNA 的表現。因為葉綠體轉殖的文獻中並沒有轉基因沉默的報告 (Ahmad *et al.*, 2016)。所以推測可能是 PCR 或 RT-PCR 檢測技術上的問題。

參 考 文 獻

- 吳致淵。2012。 *Xanthomonas* 細菌素基因及抗菌胜肽於大腸桿菌表現及純化之探討。國立中興大學分子生物學研究所碩士論文。
- 陳慶三。2005。抗蟲蛋白質。科學發展。392:12-15。
- 謝廷芳。2004。蘭花真菌性與細菌性病害的介紹及防治。蘭花種苗病毒驗證制度及病蟲害整合性防治講習會。台灣蘭花產銷發展協會。pp.250-259。
- 廖珮鑾。2006。 *Xanthomonas* 細菌素基因的篩選及在 *E. coli* 中表現。國立中興大學分子生物學研究所碩士論文。
- 傅承泰、潘怡君、曾夢蛟。2020。蝴蝶蘭葉綠體基因轉殖載體之構築與分析。興大園藝。45(1): 95-114。
- Ahmad, N., F. Michoux, A. G. Lössl, and P. J. Nixon. 2016. Challenges and perspectives in commercializing plastid transformation technology. *J. Exp. Bot.* 67(21): 5945-5960.
- Lee, S. B., B. Li, S. Jin, and H. Daniell. 2011. Expression and characterization of antimicrobial peptides Retrocyclin-101 and Protegrin-1 in chloroplasts to control viral and bacterial infections. *Plant Biotechnol. J.* 9(1): 100-115.
- Loessner, M. 2005. Bacteriophage endolysins-current state of research and application. *Curr. Opin. Microbiol* 8: 480-487.
- Ogihara, Y., T. Terachi, and T. Sasakuma. 1988. Intramolecular recombination of chloroplast genome mediated by short direct-repeat sequences in wheat species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85(22): 8573-8577.
- Sinagawa-García, S. R., T. Tungsuchat-Huang, O. Paredes-López,, and P. Maliga. 2009. Next generation synthetic vectors for transformation of the plastid genome of higher plants. *Plant Mol. Biol.* 70(5): 487-498.

Studies on Transferring Lysozyme and Cecropin Genes into the Chloroplast of *Phalaenopsis* Orchid

Cheng-Tai Fu¹⁾ I-Chun Pan²⁾ Menq-Jiau Tseng³⁾

Key words: *Phalaenopsis* orchid, Chloroplast gene transformation, Lysozyme, Cecropin

Summary

The objectives of this study are to establish the transplastomic system of *Phalaenopsis* orchid and to explore the possibility for transplastomic *Phalaenopsis* orchid with disease resistance by engineering the lysozyme (*lys*) and cecropin (*cerA*) genes. Constructed vectors harboring the *cerA* and *lys* genes were bombarded into the PLB of *Phalaenopsis* and selected by Spectinomycin. The results of PCR and RT-PCR analysis indicated that the transformed genes were presented in the transplastomic *Phalaenopsis* orchid plants and its mRNAs were expressed.

-
- 1) Student in Ph.D. program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.
 - 2) Associate Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.
 - 3) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.