

## 抗病基因(*lys*、*cecB*)及調控春化作用基因(*VRN1*、*AGL19*)轉殖到蝴蝶蘭之研究

尤 振 豪<sup>1)</sup> 潘 怡 君<sup>2)</sup> 施 惠 蓉<sup>3)</sup> 曾 夢 蛟<sup>4)</sup>

關鍵字：基因轉殖、蝴蝶蘭、溶菌酶、抗菌胜肽、調控春化作用基因

**摘要：**蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis*)為重要觀賞植物之一。然而蝴蝶蘭新品種育成時間較長，以及蝴蝶蘭栽培環境多高溫多濕而造成嚴重的細菌性病害，且蝴蝶蘭需經過一段幼年期才具開花能力。為降低蝴蝶蘭的栽培成本與耗損率，並提高產業競爭力，本研究分別使用基因槍轉殖法與農桿菌轉殖法進行蝴蝶蘭之葉綠體與細胞核基因轉殖，轉殖目標基因的調控系統為酒精誘導型啟動子 (*alc* 系統，包含轉錄因子 *AlcR* 與啟動子 *AlcA*)。本研究已完成下列二項基因轉殖工作包括：1.利用基因槍轉殖法將 *alc* 系統和抗病蛋白基因 (*cecB*、*lys*)轉入至蝴蝶蘭葉綠體基因組中、2.利用農桿菌轉殖法將 *alc* 系統和春石斛蘭春化基因 (*VRN1*、*AGL19*) 轉入至蝴蝶蘭細胞核基因組中。分別以 D-alanine 和 BASTA®持續篩選培植體，已獲得擬轉殖再生蝴蝶蘭植株。進行 PCR 分析擬轉殖再生蝴蝶蘭植株之結果顯示，轉錄因子 *AlcR* 基因、*cecB* 和 *lys* 基因已存在於蝴蝶蘭葉綠體基因組中，此外 *AlcR*、*VRN1* 及 *AGL19* 基因已存在於蝴蝶蘭細胞核基因組中。RT-PCR 分析結果顯示僅偵測到 *lys*、*AGL19* mRNA。

### 前 言

蝴蝶蘭(*Phalaenopsis*)因花卉性狀和開花特性，在世界花卉產業中具重要的經濟價值(Hinsley et al., 2018; Tong et al., 2020)；另外行政院農業統計資料查詢系統顯示蝴蝶蘭在臺灣花卉產業中且是主要外銷花卉之一。現今消費市場的蝴蝶蘭品種更換率極高，以及蝴蝶蘭新品種之育成時間長(吳等, 2016)，為達到快速改良蝴蝶蘭之目的，利用基因轉殖法進行外源基因或內源基因之轉殖，將可調節適時表現於特定生長階段以改善蝴蝶蘭的性狀，

- 
- 1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生。
  - 2) 國立中興大學園藝系副教授。
  - 3) 國立中興大學園藝學系研究助理。
  - 4) 國立中興大學園藝系教授，通訊作者。

期望能解決蝴蝶蘭產業所面臨的問題與困境。

臺灣蝴蝶蘭產業多利用溫室進行栽培，但其內部常發生高溫多濕，並提高病原菌侵染蝴蝶蘭的機會。蝴蝶蘭病害包含細菌性病害和真菌性病害(賴和黃，2001)，且蝴蝶蘭的栽培時間與成本高，若當病害全面蔓延後進而會發生重大損失(位，1994)，防治蝴蝶蘭的病害是產業生產上重要的議題。

蝴蝶蘭須經長時間幼年性 (juvenility)，才能感應低溫刺激，進而抽梗與開花 (李和王，1997)，此特性間接提高栽培面的成本。另外臺灣農民為了對蝴蝶蘭進行催花，多採用高海拔地區的低溫或冷房催花(葉，2011)，兩種方式都會增加生產成本，就此另一重要議題是改善調節蝴蝶蘭開花的技術。

能在適當的時間及空間，有效地操縱及調控目標基因的大量表現，而不影響植物本身的正常生長發育的前題下，誘導型啟動子的研究就因應而生。其中乙醇誘導基因表現系統 (ethanol-induced expression system; alc 系統)屬化學藥劑誘導型，能快速誘導目標基因高效表現。Alc 系統源於小巢狀麴菌 (*Aspergillus nidulans*)的 *alc* 調控組 (regulon)。當酒精存在時，能誘導 AlcR 基因表現轉錄因子 ALCR，並夠辨識並結合在 *alcA* 啟動子誘導其基因表現 (Lockington et al., 1985)。目前已在阿拉伯芥、菸草、馬鈴薯、油菜、番茄、胡楊、大豆及甘蔗等植物的基因轉殖均有成功應用的報導。Alc 系統由於內生性表現低，誘導效率高，誘導劑於一定濃度下屬安全無毒等優勢，在生產應用上有巨大潛力，已陸續被證實應用在於植物基因轉殖及分析基因功能，少量的乙醇即對基因表現有顯著影響。然而大多數研究都是以報導基因 (*GUS*、*LUC*)做誘導效率方面的研究，用來進行功能性分析的研究較少，且在轉殖園藝作物的研究也很少，有待更進一步研究及突破。

為解決蝴蝶蘭的病害議題與開花瓶頸，及嘗試利用 *alc* 系統來有效調控轉基因的適時表現，本研究分別利用葉綠體基因轉殖法與農桿菌基因轉殖法進行蝴蝶蘭轉基因之研究。

本研究轉殖之蝴蝶蘭葉綠體的抗病基因包括昆蟲的抗菌肽—天蠶素 (*cecropinB*，*cecB*) 以及噬菌體的溶菌酶 (*lysozyme*，*lys*) 基因，其中抗菌肽基因是源自蒼蠅 (*Musca domestica*) *cecropin B* 基因，溶菌酶基因源自 *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) (廖，2006)。將 *cecB* 與 *lys* 基因黏合成 *cecB-lys* 基因串，所形成之融合蛋白更能提升兩種蛋白之相對殺菌活性 (吳，2012)。利用葉綠體基因轉殖法將 *cecB-lys* 基因轉殖於蝴蝶蘭葉綠體中，以酒精誘導之方式在適當的時間點誘導其大量表現，預期將可提高蝴蝶蘭之抗病性。

春石斛蘭 *VERNALIZATION 1* (*VRN1*)和 *AGAMOUS-LIKE 19* (*AGL19*)基因為春化作用之 *FLC* 不依賴途徑 (*FLC*-independent pathway)的開花調控基因 (楊，2015)。利用農桿菌基因轉殖法將 *VRN1* 和 *AGL19* 基因，共同轉殖到蝴蝶蘭細胞核內，以酒精適時誘導其大量表現，預期將可調控蝴蝶蘭花期及開花，並可省略春化作用的步驟，再次提高國內蝴蝶蘭產業的永續發展。本研究之目的為開發酒精誘導型啟動子 (*Alc* 系統)應用在蝴蝶蘭基因轉殖之系統，及探討利用基因轉殖培養成抗病及可調控花期之蝴蝶蘭的可行性。

## 材料與方法

### 一、試驗材料

#### (一)、基因轉殖之植物材料

本試驗使用植物材料為蝴蝶蘭商業品種 *Phalaenopsis* 'SPH41D'，作為基因轉殖之植物材料。於無菌操作臺內操作材料增殖，單一擬圓球體 (protocorm-like body, PLB) 切去其頂芽距離至吸收毛以上，培養於 T2 再生培養基中 (hyponex No.1 (花寶 1 號) 3.5g/L、tryptone 1g/L、citric acid 0.1g/L、myo-inositol 0.1 g/L、sucrose 20g/L、紅肉地瓜 20g/L、香蕉 25g/L，使用 1 N KOH 和 1 N HCl 進行定 pH 至 5.5 ( $\pm 0.02$ ) 後，再加入 charcoal 1g/L、phytigel 3g/L)。於培養室進行培養 ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，光週期 12/12 小時 (照光/黑暗))，於基因槍轟擊試驗前，緊密排列材料於培養基正中央 (3 公分同心圓大小之範圍)，並癒傷 1 週後，以及於農桿菌感染試驗將材料培養於培養基並癒傷 1 週，待後續進行基因轉殖試驗。

#### (二)、轉殖基因與載體

基因轉殖試驗分為基因槍基因轉殖與農桿菌基因轉殖，共計二部份試驗：

##### 1. 基因槍基因轉殖試驗之轉殖載體

本試驗使用 *E. coli* DH5 $\alpha$  之勝任細胞 (competent cells)，攜帶之質體 DNA 為 pMT-93-alcCLGD (圖 1A) (蝴蝶蘭之葉綠體基因轉殖載體) (由楊明德教授實驗室馮潔雯學姐所構築)。

##### 2. 農桿菌基因轉殖試驗之轉殖載體

本試驗使用之農桿菌菌系為 *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101)。轉殖載體 pMLBART-AlcR-AlcA-VRN1 (圖 1B) (目標基因為 *Den. To My Kids* 'Smile' 之 *VRN1*) 和 pMLBART-AlcR-AlcA-AGL19 (圖 1C) (目標基因為金釵石斛 *AGL19*)，其中目標基因之啟動子為 *AlcA* (受到 *AlcR* 蛋白及乙醇調控)，篩選標誌基因為 *bar*，均由本實驗室楊舜閔學長所構築。

### 二、試驗方法

#### (一) 基因槍轉殖試驗

以單一菌落接種於 LB 培養液 (含 ampicillin 75 ppm)，於培養箱暗培養、 $37^{\circ}\text{C}$ 、100 rpm、12 至 16 小時，並以鹼裂解法萃取大量質體 DNA。以分光光度計測定質體 DNA 核酸濃度，將質體 DNA 濃度調整至  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，儲存於  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱備用。

進行轟擊用金粒子清洗之步驟。使用無菌操作臺、無菌水、無菌甘油、eppendorf、無水酒精。基因槍轟擊使用之微載體 ( $0.6 \mu\text{m}$  gold microcarriers 50 mg)，加 1 mL 70% 酒精，高速震盪 2 分鐘，離心 (600 g 室溫 30 秒) 去除上清液，加無菌水，高速震盪 2 分鐘，離心 (600 g 室溫 30 秒) 去除上清液，重複清洗步驟 3 次。金粉清洗完畢並加滅菌之 833  $\mu\text{L}$

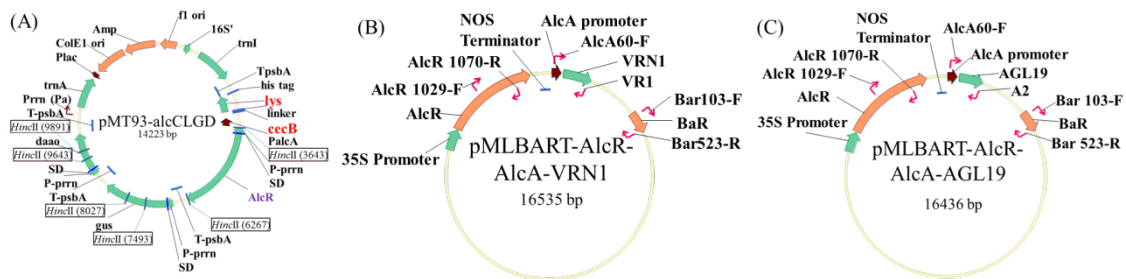


圖 1. 蝴蝶蘭轉殖載體之基因圖譜。(A)蝴蝶蘭葉綠體轉殖載體 pMT93-alcCLGD。(B)蝴蝶蘭農桿菌轉殖載體 pMLBART-AlcR-AlcA-VRN1。(C)蝴蝶蘭農桿菌轉殖載體 pMLBART-AlcR-AlcA-AGL19。

Fig. 1. Genetic maps of Phalaenopsis transformation vectors. (A) Phalaenopsis chloroplast transformation vectors pMT93-alcCLGD. (B) Phalaenopsis *Agrobacterium* transformation vectors pMLBART-AlcR-AlcA-VRN1. (C) Phalaenopsis *Agrobacterium* transformation vectors pMLBART-AlcR-AlcA-AGL19.

50 % glycerol，高速震盪 2 分鐘，分裝至新離心管中每管 50  $\mu$ L，並儲存於-20 $^{\circ}$ C 備用。

進行金粒子質體 DNA 鍍膜 (coating)之步驟。使用無菌操作臺、滅菌過內用 tip、2.5 M CaCl<sub>2</sub>、spermidine (15  $\mu$ L+水定量至 1 mL，並過 minipore)。取 50  $\mu$ L 金粉，以微量吸管吸取 5  $\mu$ L 混合完成之轉殖載體 DNA，進行吸取混合均勻。緩慢加入 50  $\mu$ L CaCl<sub>2</sub>，一邊加入一邊用 tip 攪拌均勻，之後吸取混合均勻。吸取 20  $\mu$ L spermidine，加入管中，之後吸取。置於室溫 10 分鐘。離心(600 g 17 秒)。去上清，加入無水酒精 150  $\mu$ L 後，進行吸取。再進行離心(600 g 17 秒)。去上清，加入無水酒精 55  $\mu$ L，混合均勻。

基因槍轟擊實驗使用 Biolistic® PDS-I000/He Particle Delivery System。

轟擊後篩選、再生、增殖、出瓶之步驟。PLB 於轟擊後進行暗處理 2 天，並培養於 T2 再生培養基癒傷約 1 個月後，培養於篩選再生培養基 (含 50ppm D-alanine)進行篩選，後續存活的擬轉植株培養於 T2 再生培養基上使其恢復生長勢，再生約 1~1.5 個月。將擬轉植株培養於培植瓶進行健化 2~4 個月。

## (二) 農桿菌轉殖試驗

農桿菌感染步驟。單一菌落接種於 LB 液體培養基 (含 gentamycin 30 ppm+spectinomycin 50 ppm)，並於培養箱中暗培養(100 rpm、2 天、28 $^{\circ}$ C)。欲感染前 4 小時加入 AS 進行致病基因(virulence gene)之活化。離心農桿菌菌液(5000 rpm 4 $^{\circ}$ C 離心 10 分鐘)。去上清。加等量共培養液體培養基 (MS 培養基 powder 4.4g/L、sucrose 20g/L，使用 1 N HCl 和 1 N KOH 進行定 pH 至 5.5，最後 0.1 g/L 金鋼沙)和 AS。再懸浮 pellet。放入培植體進行共培養(30 分鐘、100 rpm、28  $^{\circ}$ C)。去除液體培養基，晾乾培植體，繼代於

固體共培養培養基進行共培養 (3 天, 28°C)。培植體 wash 步驟, 使用無菌水 (含 cefotaxime 500 ppm) 進行 wash, 10 分鐘, 150 rpm, 去除懸浮液, 進行三次。晾乾培植體, 培養於再生培養基 (含 cefotaxime 500 ppm) 進行再生。

感染後篩選、再生、增殖、出瓶之步驟。待培植體再生約 1.5~2 個月, 再進行篩選。使用含有 BASTA® 之再生培養基進行篩選, 約 1 個月。篩選後之培植體繼代於再生培養基 (含 cefotaxime 250 ppm) 進行再生、癒傷與誘導發根, 待根系發展後進行出瓶, 以浸泡過消毒水之水苔為介質, 定植於 2 吋盆中。

### (三) 擬轉殖植株分析

#### 1. 擬轉殖植株基因體 DNA 檢測

本試驗使用 Plant Genomic DNA Purification Kit 萃取植物 genomic DNA。以聚合酶連鎖反應 (PCR) 分析方式進行偵測擬轉殖植株基因組的目標基因之轉入, 以欲轉入之質體 DNA 作為對照組, 對比擬轉殖植株中是否有目標基因之轉入。以 Analytik Jena Biometra TOne Thermal Cycler 進行 PCR 增幅待檢測目標基因片段, 以擬轉殖植株 genomic DNA 1  $\mu$ L 作為複製範本, 並以 1 倍 EBL PCR Master Mix (Red dye) 與 1  $\mu$ M 核酸引子再加去離子水補足容積至 25  $\mu$ L, 隨後進行 PCR, 待 PCR 反應完畢後, 取產物 3  $\mu$ L 使用電泳分析。

PCR 反應設定條件如下; 第一階段為 95°C、5 分鐘 denaturation (1 循環)。第二階段進行 95°C、30 秒的 denaturation、30 秒的 Annealing, 黏合溫度如表一、72°C 的 extension, 延長時間依照表一之預期片段大小調整, 第二階段共 40 循環。第三階段為 72°C、10 分鐘 (1 循環)。

#### 2. 植物材料之酒精處理

取用擬轉殖植株植物材料, 並使用酒精進行構築酒精誘導啟動子 (*AlcA*) 之目標基因 mRNA 的誘導。將葉片浸泡至含有 2% 酒精之 PBS buffer (pH7.4, 50 mM), 真空抽氣 5 分鐘, 放到室溫照光培養。抽取處理前 (0 小時) 及處理後 12 小時葉片之總 RNA 進行反轉錄聚合酶連鎖反應分析基因表現。

#### 3. 擬轉殖植株 mRNA 檢測

使用 NC RNA Extraction Reagent 進行植物總 RNA 之萃取。於 RNA 回溶步驟: 使用 DEPC 水回溶 RNA, 儲存在 -70°C 下。反轉錄聚合酶連鎖反應 (Reverse Transcription PCR, RT-PCR) 之步驟。使用 HiScript I TM First Strand cDNA Synthesis Kit 進行反轉錄反應。後續以 cDNA 作為範本進行聚合酶連鎖反應。

## 結 果

本試驗以蝴蝶蘭 *Phalaenopsis* 'SPH41D' 之 PLB 進行基因轉殖。基因轉殖分成二個試驗。試驗一: 以基因槍法轉殖 pMT-93-alcCLGD 到蝴蝶蘭葉綠體, 以及試驗二: 以農桿菌

表 1. 偵測目標基因使用的引子與 PCR 所使用的黏合溫度以及預期片段的長度。  
Table 1. Primer sequence, annealing temperature, and predicted size for the detection of target gene.

目標基因 (Target gene)	引子 (Primer)	序列 (Sequence)	黏合溫度 Annealing Temp. (°C)	預期片段大小 Predicted size
<i>lysozyme</i>	1-lys 444bp-F	5'-GGTGCCTTTGACATATACCC-3'	54	444 bp
	1-lys 444bp-R	5'-ATGAGCCAGACCGCTAAA-3'		
<i>cecropinB</i>	Nco-cecB	5'-CCATGGGCAAGTGGAAAGGTTTCAAGAA G-3'	62	119 bp
	Xho-cecB	5'-GTCGAGCAAAGCCTTAGCTTCACCCAAA C-3'		
<i>lys-cecB</i>	1-lys-cecB 590bp-F	5'-CGCTGACGACGTTATC-3'	50	590 bp
	1-lys-cecB 590bp-R	5'-AGAAACGGTATTGTTAAGGCT-3'		
<i>VRN1</i>	AlcA60-F	5'-TGACACACCACTCCTCTCCA-3'	61	918 bp
	VR1	5'-GTGCCTGAGGTGATTCTTCTTC-3'		
<i>AGL19</i>	AlcA60-F	5'-TGACACACCACTCCTCTCCA-3'	50	878 bp
	A2	5'-TCACAATCCATCTACGTATAGTTCG-3'		
<i>AlcR</i>	AlcR 1029-F	5'-CTGGCGATCGTAGCTTTTGC-3'	59	942 bp
	AlcR 1070-R	5'-TGGTTGGTACTTCGCTGTCC-3'		
<i>daao</i>	DAAO-1	5'-ATGGCTAAAATCGTTGTTATTGGTGCC-3'	55	1070 bp
	DAAO-2	5'-CTAAAGGTTTGACGAGTAAGAGCTCT-3'		
<i>Bar</i>	Bar103-F	5'-ACATCGAGACAAGCACGGTC-3'	55	421 bp
	Bar523-R	5'-AAGTCCAGTGCCAGAAACC-3'		

法共同轉殖 pMLBART-AlcR-AlcA-VRN1 與 pMLBART-AlcR-AlcA-AGL19)。試驗首先進行蝴蝶蘭之基因轉殖、培植體篩選、再生、出瓶培植，後續進行聚合酶連鎖反應(PCR)檢測擬轉殖蝴蝶蘭，最後使用反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-PCR)分析擬轉殖蝴蝶蘭。

#### 一、試驗一：基因槍法轉殖 pMT93-alcCLGD 至蝴蝶蘭之葉綠體

##### (一)、蝴蝶蘭之基因槍基因轉殖、培植體篩選、再生、出瓶培植

本試驗使用 pMT-93-alcCLGD 載體，將目標基因轉殖到蝴蝶蘭'SPH41D'PLB 葉綠體中，並藉由篩選藥劑 D-alanine 對擬轉殖 PLB 進行篩選，待擬轉殖 PLB 誘導出長出擬轉殖株，最終出瓶栽培。將蝴蝶蘭 PLB 於基因槍轟擊前 7 天進行切除頂芽之處理，大小約 0.4~0.5 mm 之 PLB 經切除頂芽至吸收毛之部位，並平放於培養基中心圍成一個圓（直徑約 2.5~3.0 cm），並準備進行基因槍轟擊，待其轟擊完畢並暗處理進行癒傷 2 天（圖 2A~B），癒傷以 D-alanine 300 ppm 進行篩選（圖 2C），多數培植體會發生黑化死亡之現象，僅有極少數培植體能再生 PLB（圖 2D~E）。待 PLB 發育出頂芽之前，持續進行更換篩選培養基（圖 2F）。惟發育出頂芽後，以 D-alanine 500 ppm 之篩選培養基中進行篩選，並於約 30 天更換至新的篩選培養基，並維持篩選壓力。經 D-alanine 篩選而死亡之培植體會發生白化，死亡過程的初期中，頂芽中心明顯有黃化現象，黃化部位漸進轉變成白化，最終整個培植體進而完全白化（圖 2G~J）。將殘存之培植體移植至含 D-alanine 500ppm 之篩選培養基持續進行篩選（圖 2K~L），待擬轉殖培植體發育出根系，即可移植不含 D-alanine 篩選藥劑之培植瓶中進行培養（圖 2M~R）。後續步驟為擬轉殖株出瓶移至溫室生長（圖 2S~AB）。為提

高出瓶栽培之擬轉殖蝴蝶蘭之存活率，於擬轉殖蝴蝶蘭之葉片大小至少 1 公分，氣生根有 2 根即進行健化，置於溫室床架約 7 天再進行出瓶之動作。出瓶時為降低擬轉殖蝴蝶蘭之傷害並提高存活率，利用水作為緩衝，並將培養基和擬轉殖蝴蝶蘭均浸於含介面活性劑之水中後，並清洗擬轉殖蝴蝶蘭上之殘存培養基，以及剔除擬轉殖蝴蝶蘭上之老化組織。為讓擬轉殖蝴蝶蘭在出瓶時所造成的傷口晾乾，拭去擬轉殖蝴蝶蘭殘留的水痕，並於室溫晾乾後，進行上盆。將水苔與盆器進行稀釋之次氯酸水之消毒，並利用水苔包裹擬轉殖蝴蝶蘭之根系並培植於盆器中，噴施殺菌劑且保持濕度，於充分光照下栽培。

## (二)、聚合酶連鎖反應(PCR)檢測擬轉殖蝴蝶蘭

本試驗中經由基因槍轟擊之蝴蝶蘭 PLB，透過 D-alanine 篩選、誘導再生成擬轉殖株。萃取植物之 genomic DNA 進行聚合酶連鎖反應 (PCR) 分析以檢測轉基因之存在與否。

PCR 檢測轉基因 *lys* 所使用之引子為 1-*lys* 444bp-F (forward primer) 和 1-*lys* 444bp-R (reverse primer)。 *Lys* 基因全長共為 534 bp，經 PCR 檢測之產物大小為 444 bp。經 PCR 檢測顯示有轉基因 *lys* 之存在的蝴蝶蘭葉綠體轉殖系為 D05、D06、D07、D08、D09、D10、D11、D12、D13、D14、D15、D17、D19、D20、D21、D24、D29、D34、D37、D50，以及 D51，共 21 個轉殖系 (圖 3A)。在未轉殖之蝴蝶蘭 (CK) 則未檢測到此基因片段。

PCR 檢測轉基因 *cecB* 所使用之引子為 Nco-*cecB* (forward primer) 和 Xho-*cecB* (reverse primer)。 *CecB* 基因全長共為 117 bp，經 PCR 檢測之產物大小為 119 bp，為覆蓋 *cecB* 全長之 100 %。經 PCR 檢測並有轉基因 *cecB* 之存在的蝴蝶蘭葉綠體轉殖系為 D05、D06、D07、D09、D10、D11、D12、D13、D17、D20、D21、D24、D31、D33、D34、D36、D37，以及 D38，共 18 個轉殖系 (圖 3B)。在未轉殖之蝴蝶蘭 (CK) 則未檢測到此基因片段。

為確認蝴蝶蘭轉殖系中同時存在轉基因 *lys-cecB* 之準確性，以 PCR 檢測黏合的二個轉基因 *lys-cecB*。PCR 檢測轉基因 *lys-cecB* 所使用之引子為 1-*lys-cecB* 590bp-F (forward primer) 和 1-*lys-cecB* 590bp-R (reverse primer)。 *Lysozyme-cecropinB* 基因全長共為 699bp，經 PCR 檢測之產物大小為 590 bp，並覆蓋全長之 84.4 %。經 PCR 檢測並有轉基因 *lys-cecB* 之存在的蝴蝶蘭葉綠體轉殖系為 D01、D02、D04、D07、D09、D10、D12、D13、D14、D19、D20、D23、D24、D26、D30、D32、D33、D34、D37，以及 D38，共 20 個轉殖系 (圖 3C)。在未轉殖之蝴蝶蘭 (CK) 則未檢測到此基因片段。

PCR 檢測轉基因 *AlcR* 所使用之引子為 AlcR 1029-F (forward primer) 和 AlcR 1070-R (reverse primer)。 *AlcR* 基因全長 2466 bp，經 PCR 檢測之產物大小為 942 bp，並覆蓋 *AlcR* 基因全長之 38.1 %。經 PCR 檢測並有轉基因 *AlcR* 之存在的蝴蝶蘭葉綠體轉殖系為 D05、D06、D07、D09、D10、D12、D13、D14、D15、D17、D19、D24、D28、D30、D32、D35、D36、D37、D38、D41、D42、D43、D46、D49，以及 D51，共 25 個轉殖系 (圖 3D)。在未轉殖之蝴蝶蘭 (CK) 則未檢測到此基因片段。

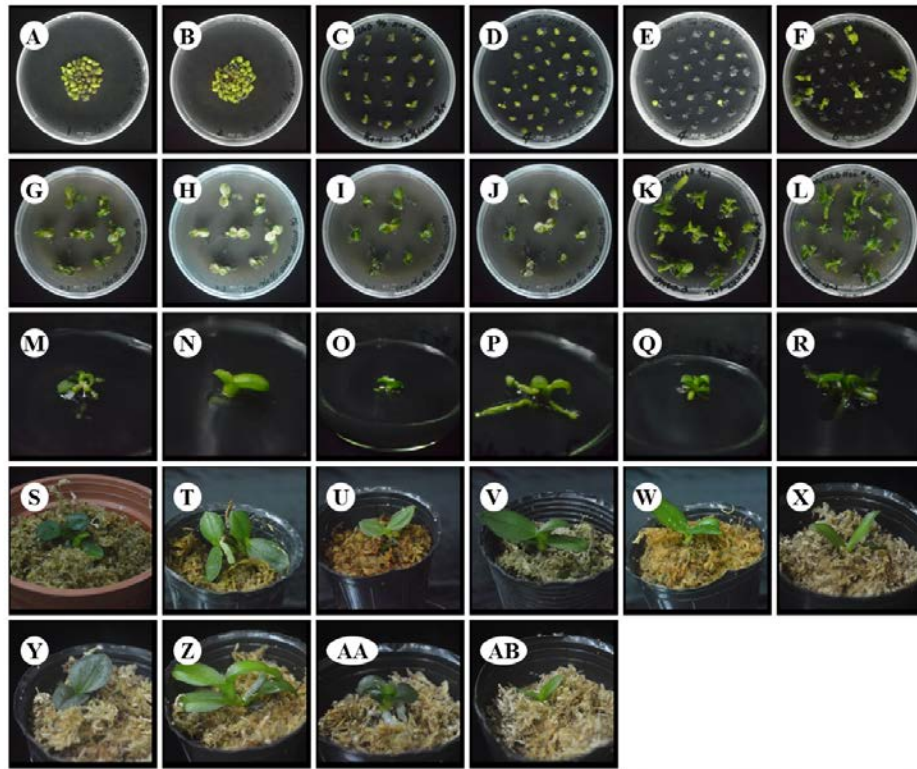


圖 2. 基因槍轉殖 pMT93-alcCLGD 至葉綠體之擬轉殖蝴蝶蘭 *Phalaenopsis* 'SPH41D' 的篩選、再生與增殖情形。

Fig. 2. Selection, regeneration, and proliferation of putative transplastomic *Phalaenopsis* 'SPH41D' via particle gun bombardment with pMT93-alcCLGD.

PCR 檢測轉基因 *daao* 所使用之引子為 DAAO-1 (forward primer) 和 DAAO-2 (reverse primer)。 *daao* 基因全長 1071 bp，經 PCR 檢測之產物大小為 1071 bp，並覆蓋 *daao* 基因全長之 100 %。經 PCR 檢測並有轉基因 *daao* 之存在的蝴蝶蘭轉殖系為 D05、D06、D07、D09、D10、D13、D14、D16、D17、D20、D26，以及 D32，共 12 個轉殖系 (圖 3E)。在未轉殖之蝴蝶蘭 (CK) 未檢測到此基因片段。

### (三)、反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-PCR)分析擬轉殖蝴蝶蘭

為確認轉殖基因之表現狀況，且其 mRNA 有成功轉錄，取擬轉植株葉片之植物材料萃取其 RNA 後並反轉錄成 cDNA，再進行 PCR 增幅，以檢測擬轉植株目標基因 *lys* (圖 4I) 和 *cecB* (圖 4II) 之 mRNA 轉錄情況。分析結果顯示，經電泳分析，D29、D34，以及 D38 轉殖系為成功轉錄 *lys* 基因之擬轉殖蝴蝶蘭轉植株(圖 4I)。



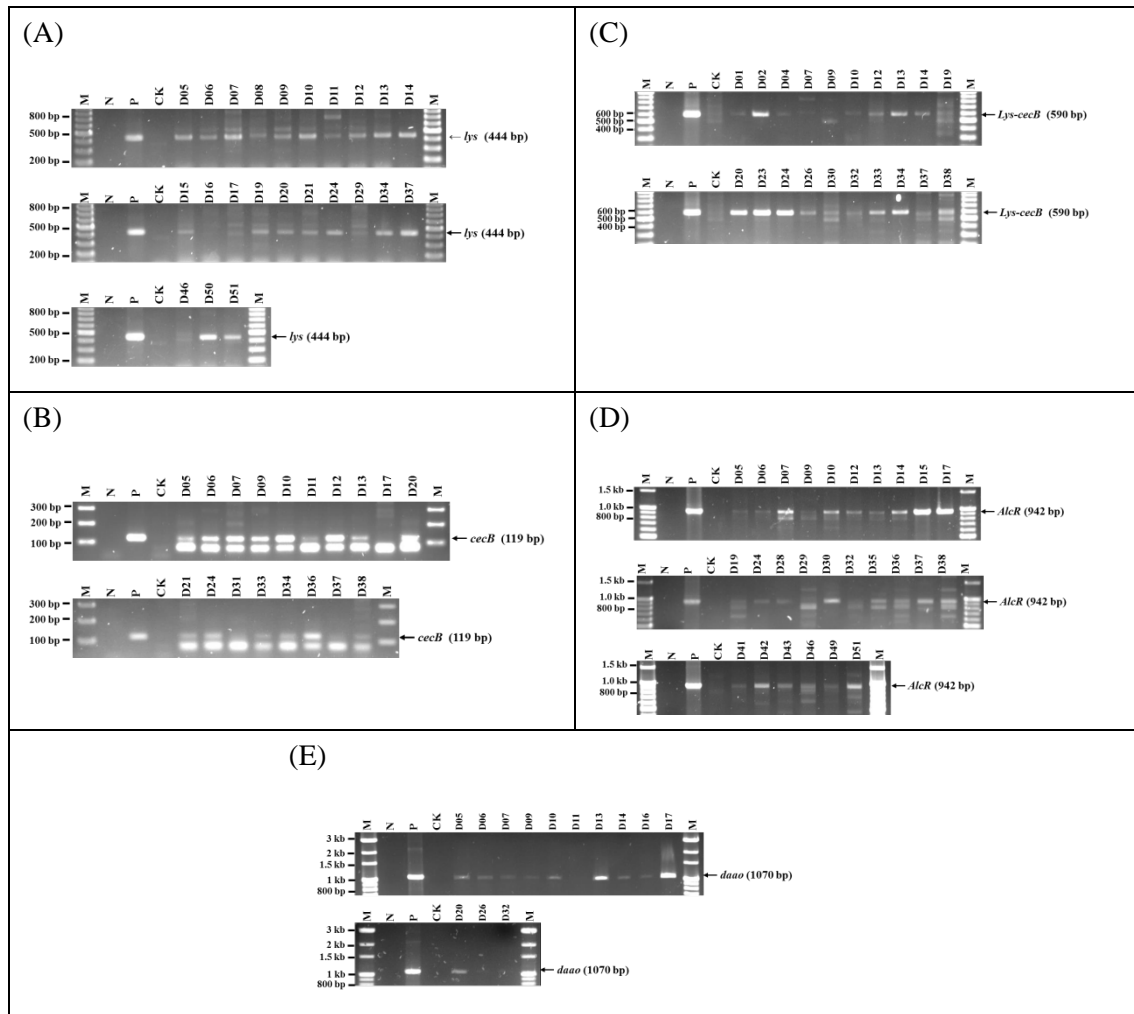


圖 3. 以 pMT93-alcCLGD 轉殖的擬轉殖蝴蝶蘭的葉片 DNA 為模板，使用獨特核酸引子進行聚合酶連鎖反應，將產物 *lys* (444 bp)(A)、*cecB* (119 bp) (B)、*lys-cecB* (590 bp) (C)、*AlcR* (942 bp) (D)、*daao* (1070 bp) (E) 等基因片段，以電泳膠片分析之結果。CK：未轉殖植株。

Fig. 3. PCR analysis of *lys* (444 bp) (A), *cecB* (119 bp) (B), *lys-cecB* (590 bp) (C), *AlcR* (942 bp) (D), and *daao* (1070 bp) (E) gene fragments in putative pMT93-alcCLGD transplastomic *Phalaenopsis* leaves by using unique primers. CK: untransformed plants.

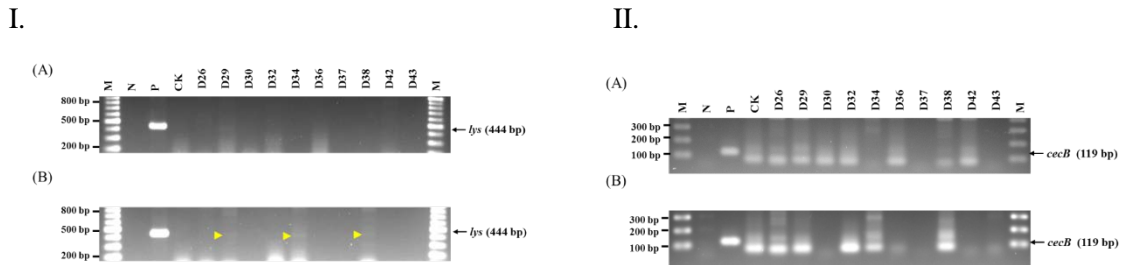


圖 4. 轉殖 pMT93-alcCLGD 之蝴蝶蘭擬轉殖植株，以 2% 酒精處理前(A)及處理 12 小時後 (B)，經 RT-PCR 分析 *lys* (444 bp) (I) 與 *cecB* (119 bp) (II) mRNA 之情形。CK：未轉殖植株。

Fig. 4. RT-PCR analysis of *lys* (444 bp) (I) and *cecB* (119 bp) (II) mRNA in putative pMT93-alcCLGD transplastomic *Phalaenopsis* before (A) and after treated with 2% alcohol for 12 hrs (B). CK: untransformed plants.

## 二、試驗二：農桿菌法共同轉殖 pMLBART-AlcR-AlcA-VRN1 與 pMLBART-AlcR-AlcA-AGL19 至蝴蝶蘭

### (一)、蝴蝶蘭之農桿菌基因轉殖、培植體篩選、再生、出瓶培植

本試驗使用農桿菌法將 pMLBART AlcA-AlcR-VRN1 與 pMLBART AlcA-AlcR-AGL19 共同轉殖至蝴蝶蘭 *Phalaenopsis* 'SPH41D' PLB 之細胞核基因組。將農桿菌共同轉殖前之 PLB 進行去除頂芽處理並癒傷 7 天 (圖 5A)。將農桿菌感染後之蝴蝶蘭 PLB 使用含 cefotaxime 500 ppm 清洗，並移植於含 cefotaxime 500 ppm 之再生培養基 (圖 5B)，進行再生培養 30 至 45 天後，將再生之 PLB 分開並單一培植於培養基中，同一個轉殖系放置於同一區塊 (圖 5C~F)。將擬轉殖培植體以含 BASTA® 1 ppm 進行擬轉殖株之篩選，擬轉殖培植體經 BASTA® 篩選於頂芽開始黃化至整個培植體，頂芽漸進轉變褐化、黑化，整個培植體轉變成土黃進而死亡 (圖 5G~H)。篩選後將存活之擬轉殖蝴蝶蘭移植至不含 BASTA® 之再生培養基中恢復與增殖 (圖 5I~L)，待擬轉殖蝴蝶蘭發育出根系即移植至培植瓶 (圖 5M~O)，當根數至少 2 根即將擬轉殖株出瓶並移至溫室生長 (圖 5P~V)。

### (二)、聚合酶連鎖反應(PCR)檢測擬轉殖蝴蝶蘭

PCR 檢測轉基因 *VRN1* 所使用之引子為 AlcA60-F (forward primer)和 VR1 (reverse primer)。AlcA 啟動子至 *VRN1* 基因全長 1037 bp，經 PCR 檢測之產物大小為 918 bp。經 PCR 檢測並有轉基因 *VRN1* 之存在的蝴蝶蘭轉殖系為 VA02、VA03、VA04、VA05、VA06、VA07、VA08、VA09，以及 VA10，共 10 個轉殖系 (圖 6A)。在未轉殖之蝴蝶蘭 (CK)則未檢測到此基因片段。

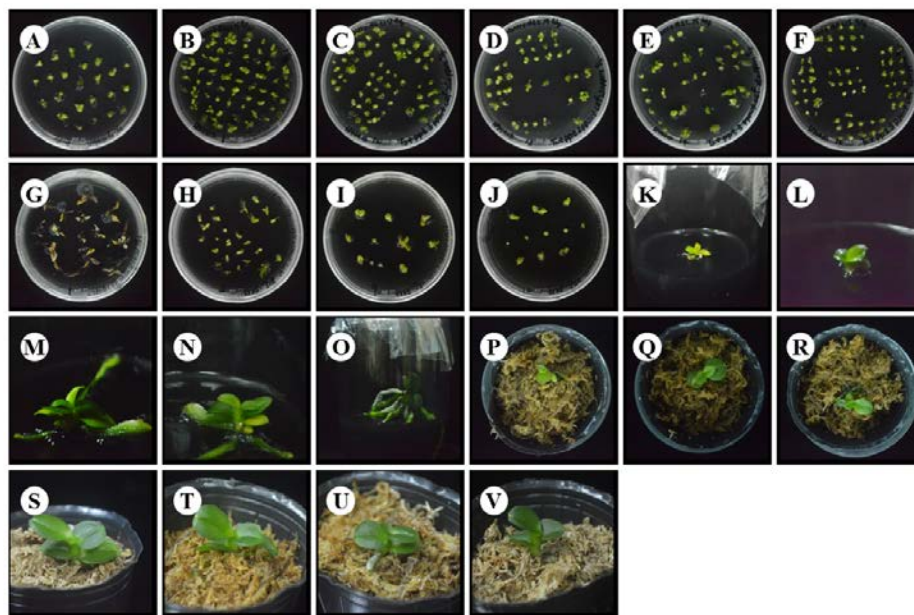


圖 5. 農桿菌共同轉殖 pMLBART AlcA-AlcR-VRN1 與 pMLBART AlcA-AlcR-AGL19 之擬轉殖蝴蝶蘭 *Phalaenopsis* 'SPH41D' 的篩選、再生與增殖情形。

Fig. 5. Selection, regeneration, and proliferation of putative transplastomic *Phalaenopsis* 'SPH41D' via *Agrobacterium* mediated co-transformation of pMLBART AlcA-AlcR-VRN1 and pMLBART AlcA-AlcR-AGL19.

PCR 檢測轉基因 *AGL19* 所使用之引子為 AlcA60-F (forward primer)和 A2 (reverse primer)。AlcA 啟動子至 *AGL19* 基因全長 918 bp，經 PCR 檢測之產物大小為 878 bp。經 PCR 檢測並有轉基因 *AGL19* 之存在的蝴蝶蘭轉殖系：VA03、VA04、VA05、VA07、VA08，以及 VA09，共 6 個轉殖系 (圖 6B)。在未轉殖之蝴蝶蘭(CK)則未檢測到此基因片段。

PCR 檢測轉基因 *AlcR* 所使用之引子為 AlcR 1029-F (forward primer)和 AlcR 1070-R (reverse primer)。AlcR 基因全長 2466 bp，經 PCR 檢測之產物大小為 942 bp。經 PCR 檢測並有轉基因 *AlcR* 之存在的蝴蝶蘭轉殖系：VA01、VA03，以及 VA04，共 3 個轉殖系 (圖 6C)。在未轉殖之蝴蝶蘭(CK)則未檢測到此基因片段。

PCR 檢測轉基因 *Bar* 所使用之引子為 Bar103-F (forward primer)和 Bar523-R (reverse primer)。Bar 基因全長 564 bp，經 PCR 檢測之產物大小為 521 bp。經 PCR 檢測並有轉基因 *Bar* 之存在的蝴蝶蘭轉殖系：VA03、VA04、VA05、VA06，以及 VA07，共 5 個轉殖系 (圖 6D)。在未轉殖之蝴蝶蘭 (CK)則未檢測到此基因片段。

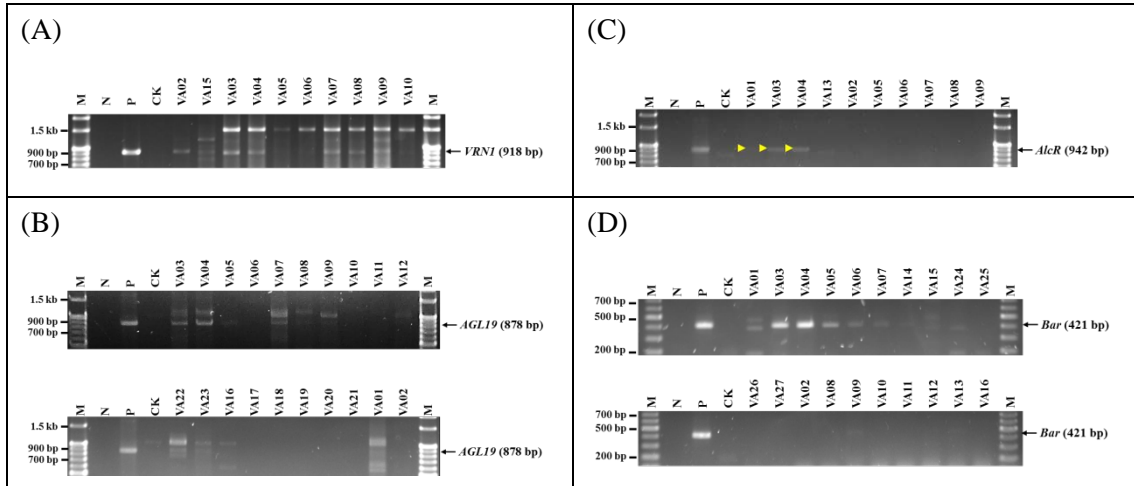


圖 6. 以共同轉殖 pMLBART AlcA-AlcR-VRN1 與 pMLBART AlcA-AlcR-AGL19 之擬轉殖蝴蝶蘭的葉片 DNA 為模板，使用獨特核酸引子進行聚合酶連鎖反應之產物，以電泳膠片分析 *VRN1* (918 bp) (A)、*AGL19* (878 bp) (B)、*AlcR* (942 bp) (C)、*Bar* (421 bp) (D) 基因片段的情形。CK：未轉殖植株。

Fig. 6. PCR analysis of *VRN1* (918 bp) (A), *AGL19* (878 bp) (B), *AlcR* (942 bp) (C), and *Bar* (421 bp) (D) gene fragments in putative transformed *Phalaenopsis* leaves via *Agrobacterium* mediated co-transformation of pMLBART AlcA-AlcR-VRN1 and pMLBART AlcA-AlcR-AGL19 by using unique primers. CK: untransformed plants.

### (三)、反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-PCR)分析擬轉殖蝴蝶蘭

為確認轉殖基因之表現狀況，且其 mRNA 有成功轉錄，取擬轉殖植株葉片之植物材料萃取其 RNA 後並反轉錄成 cDNA，再進行 PCR 增幅，以行檢測擬轉殖株目標基因 *VRN1* (圖 7I)、*AGL19* (圖 7II) mRNA 轉錄情況。分析結果顯示，經電泳分析，VA01 (1-1)、VA01 (1-2)、VA01 (1-4)、VA07、VA08、VA10、VA16、VA17、VA18，以及 VA24 轉殖系為成功轉錄 *AGL19* 基因之蝴蝶蘭轉殖株 (圖 7II)。

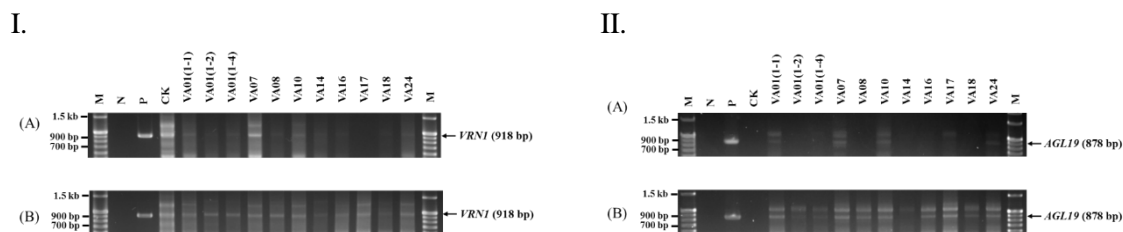


圖 7. 共同轉殖 pMLBART AlcA-AlcR-VRN1 與 pMLBART AlcA-AlcR-AGL19 之蝴蝶蘭擬轉殖植株，以 2% 酒精處理前(A)及處理 12 小時後(B)，經 RT-PCR 分析 *VRN1* (918 bp) (I) 與 *AGL19* (878 bp) (II) mRNA 之情形。CK：未轉殖植株。

Fig. 7. RT-PCR analysis of *VRN1* (918 bp) (I) and *AGL19* (878 bp) (II) mRNA in putative pMLBART AlcA-AlcR-VRN1 and pMLBART AlcA-AlcR-AGL19 co-transformed transplastomic *Phalaenopsis* before (A) and after treated with 2% alcohol for 12 hrs (B). CK: untransformed plants.

## 討 論

### 1. 蝴蝶蘭基因轉殖與再生

本試驗使用蝴蝶蘭 PLB 進行基因轉殖，主因於 PLB 相較其他植物組織有較高之再生效率。蝴蝶蘭轉殖材料在前期再生採用切除頂芽之處理，唯於後續轉殖之再生率提高，需搭配植物生長調節劑的使用，並提高轉殖批次，且審慎挑除生長狀況不良之培植體，以提高後續擬轉殖植物的發育。使用植物生長調節劑(plant growth regulator, PGR)之種類與濃度試驗不易進行，故本研究於轉殖後再對蝴蝶蘭再生培養基之配方進行調整。轉殖試驗流程中，影響 PLB 之存活的因子包括培植體生長狀況、癒傷時間長短、切除頂芽之傷口大小、培植體生長狀況，以及蝴蝶蘭品種，其中明顯觀察到經過基因轉殖流程後，玻璃質化之培植體易出現生長停滯現象。本試驗之基因槍基因轉殖目的中，經過基因槍轟擊之培植體死亡率相當高，於後續欲改善培植體前處理之方法。另外於本試驗之農桿菌基因轉殖流程中，採用未經過稀釋之農桿菌濃度進行感染，並發現農桿菌濃度對擬轉殖株之存活與再生無顯著影響，且在清洗階段以多次含有高濃度 cefotaxime 無菌水進行處理，能有效降低農桿菌之復發狀況。

### 2. D-alanine 與 BASTA®於篩選轉殖蝴蝶蘭之應用

本試驗中使用 daao 與 Bar 基因作為篩選標誌基因。D-alanine 經植物體吸收並累積到一定濃度才較為顯現毒性；在轉入 daao 基因之蝴蝶蘭 *Phal.* 'SPH41D' 培養於 D-alanine 至少 1000 ppm 篩選濃度下才具較佳篩選鑑別率。另外在未添加活性碳之培養基中，D-alanine 的篩選效果，相較含有活性碳之培養基較佳。蝴蝶蘭 *Phal.* 'SPH41D' PLB 在發育出芽與葉

的狀態下，明顯提高對於 D-alanine 的耐受性。另外 D-alanine 對於 Phal. 'SPH41D' 培植體的篩選時間長度相當長，至少須以 6 個月為基準。農藥 BASTA® 中具有毒殺植物特性的成分—phosphinothricin(PPT)能高效抑制 glutamine synthetase 的活性，並間接造成 ammonia 大量累積而毒害植物體；在轉入 Bar 基因之蝴蝶蘭 Phal. 'SPH41D' 培養於 BASTA® 1 ppm 篩選濃度下已具極佳篩選鑑別率，提高篩選濃度至 3~5 ppm 於 7 天後可明顯淘汰大量擬轉植株。此外擬轉植株經篩選後，會漸進出現生長點黑化、培植體黃化等死亡現象；經篩選存活並培養於不含 BASTA® 的培養基的擬轉植株多數易從仍維持綠色的活性狀態轉變為黃化，此狀態的植物體內累積的 ammonia 未被快速消除，並持續造成毒害。

### 3. 基因槍法轉殖 pMT93-alcCLGD (轉錄因子 *AlcR*、目標基因 *cecB* 與 *lys*、篩選基因 *daa*)

本試驗使用 pMT93-alcCLGD 蝴蝶蘭葉綠體轉殖載體，主要以 *AlcA* 為啟動子，並同時構築天蠶素基因 *cecB* 與溶菌酶基因 *lys* 以形成一操縱組(operon)，另外轉錄因子 *AlcR*、報導基因 *gus* 與篩選基因 *daa* 以 *prn* 作為啟動子。以同時轉殖的方式，試圖將載體藉由基因槍轉殖導入蝴蝶蘭葉綠體內，並希望在篩選過後，於酒精處理下，可得到能同時表現兩種抗菌基因之轉殖蝴蝶蘭。本試驗結果已成功獲得攜帶抗菌基因之葉綠體蝴蝶蘭轉殖系 (*lys* 基因：D05、06、07、D08、D09、D10、D11、D12、D13、D14、D15、D19、D20、D21、D24、D29、D34、D37、D50、D51；*cecB* 基因：D05、06、07、D09、D10、D11、D12、D13、D20、D21、D24、D31、D33、D34、D36、D37、D38)，但由於後續酒精處理後的基因表現結果不佳，故仍須進行增殖大量擬轉植株並待成長成株，以利進行乙醇誘導基因表現系統適時誘導抗菌基因大量表現，並達到抗菌的目的。

### 4. 農桿菌法共同轉殖 pMLBART-*AlcR*-*AlcA*-*VRN1* 與 pMLBART-*AlcR*-*AlcA*-*AGL19* (目標基因 *VRN1*、*AGL19*、篩選基因 *Bar*)

本試驗使用 pMLBART-*AlcR*-*AlcA*-*VRN1* 與 pMLBART-*AlcR*-*AlcA*-*AGL19* 蝴蝶蘭農桿菌轉殖載體，主要以 *AlcA* 為啟動子，並分別構築春石斛蘭春化基因 *VRN1* 與 *AGL19* 以形成一操縱組(operon)，並以 *Bar* 作篩選基因。嘗試同時轉殖的方式，試圖將二個載體以農桿菌基因轉殖法導入蝴蝶蘭細胞核內，並希望在篩選過後，於酒精處理下，可得到能同時表現兩種春化基因之轉殖蝴蝶蘭。本試驗結果之蝴蝶蘭轉殖系已成功轉入春石斛蘭春化基因 (*VRN1* 基因：VA02、VA03、VA04、VA07、VA08、VA09；*AGL19* 基因：VA03、VA04、VA05、VA07、VA08、VA09、VA22、VA23)，但由於後續酒精處理後的基因表現結果不佳，故仍須進行增殖大量擬轉植株並待成長成株，以利進行乙醇誘導基因表現系統適時誘導春石斛蘭春化基因進行表現，並達到誘導蝴蝶蘭開花的目的。

### 5. 乙醇誘導基因表現系統之應用

本試驗為達到適時調控蝴蝶蘭之性狀，以研究乙醇誘導基因表現系統於蝴蝶蘭調控基因表現之可適性，於轉殖之載體 pMT93-alcCLGD (葉綠體基因轉殖)，以及 pMLBART-

AlcR-AlcA-VRN1 與 pMLBART-AlcR-AlcA-AGL19 (農桿菌共同基因轉殖)，均以 *AlcR* 轉錄因子與 *AlcA* 啟動子進行載體構築，並進行基因轉殖。在後續為誘導乙醇誘導基因表現系統進行表現與作用，以及檢測目標基因之 mRNA 表現狀況，原預期將仍是蝴蝶蘭苗株型態之擬轉殖株直接以噴施酒精進行處理，但因擬轉殖株之植株大小與材料多寡，故對擬轉殖株進行葉片之離體處理含有 2% 酒精之 PBS buffer，並進行照光 12 小時，以誘導下游之目標基因進行表現，其中將前人結果作為試驗酒精處理時間長度基準，並於後續分析擬轉殖蝴蝶蘭之基因表現。試驗材料經處理 12 小時後，多有出現水浸狀現象，並將此試驗與現象對照前人案例中，成功藉由酒精處理，並誘導轉基因植物表現目標基因的試驗中，多以發育完全的成株進行試驗 (Caddick *et al.*, 1998; Garoosi *et al.*, 2005; Roslan *et al.*, 2001)。另外在檢測 AlcR 轉錄因子所表現之 mRNA 結果中，多無明確的正面結果，此現象對於後續目標基因之誘導、轉錄扮演關鍵角色，並影響目標基因表現量的多寡。

## 參 考 文 獻

- 位國慶。1994。臺灣蝴蝶蘭真菌及細菌病害之發生與防治。p。119-131。刊於：中華植物保護學會編印。中華植物保護學會特刊新二號。臺中。
- 吳致淵。2012。Xanthomonas 細菌素基因及抗菌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學位論文。
- 吳容儀、曹進義、莊耿彰、謝廷芳、蔡奇助、葉育哲、楊颺、胡維昭、宋品慧、賴彥旭。2016。利用異屬雜交技術開發蝴蝶蘭新性狀。蝴蝶蘭育種與品種管理策略研討會專刊。
- 李 晔、王明吉。1997。白花蝴蝶蘭由幼年到成熟相之礦物成分和碳水化合物之變化。中國園藝 43(4): 295-305。
- 楊舜閔。2015。春石斛蘭春化作用相關基因之選殖與轉殖。中興大學園藝學系碩士學位論文。
- 葉育哲。2011。利用海洋冷源作為蝴蝶蘭的涼溫催花應用。花蓮區農業專訊 (77): 6-8。
- 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。
- 賴本智、黃 昌。前言。p。7-10。刊於：李金龍發行。植物保護圖鑑系列 6—洋蘭保護。行政院農業委員會動植物防疫檢疫局。臺北。
- Caddick, M. X., Greenland, A. J., Krause, K.-P., Qu, N., Riddell, K. V., Salter, M. G., Schuch, W., Sonnewald, U., and Tomsett, A. B. 1998. An ethanol inducible gene switch for plants used to manipulate carbon metabolism. *Nat. Biotechnol.* 16(2): 177.
- Garoosi, G. A., Salter, M. G., Caddick, M. X., and Tomsett, A. B. 2005. Characterization of the

- ethanol-inducible alc gene expression system in tomato. *J. Exp. Bot.* 56(416): 1635-1642.
- Hinsley, A., De Boer, H. J., Fay, M. F., Gale, S. W., Gardiner, L. M., Gunasekara, R. S., Kumar, P., Masters, S., Metusala, D., and Roberts, D. L. 2018. A review of the trade in orchids and its implications for conservation. *Bot. J. Linn. Soc.* 186(4): 435-455.
- Lockington, R. A., Scaly-Lewis, H. M., Scazzocchio, C., and Davies, R. W. 1985. Cloning and characterization of the ethanol utilization regulon in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 33(2): 137-149.
- Tong, C. G., Wu, F. H., Yuan, Y. H., Chen, Y. R., and Lin, C. S. 2020. High-efficiency CRISPR/Cas-based editing of *Phalaenopsis* orchid MADS genes. *Plant Biotechnol. J.* 18(4): 889-891.



## Studies on Transformation of Disease Resistance Genes (*lys*, *cecB*) and Vernalization Regulating Genes (*VRN1*、*AGL19*) into *Phalaenopsis* Orchid

Zhen-Hao You<sup>1)</sup> I-Chun Pan<sup>2)</sup> Hui-Jung Shih<sup>3)</sup> Menq-Jiau Tseng<sup>4)</sup>

Key words: Gene transformation, *Phalaenopsis*, Lysozyme, Cecropin, Vernalization regulating gene

### Summary

*Phalaenopsis* has become one of the important ornamental crops. Nevertheless, breeding new varieties of *Phalaenopsis* are time-consuming. The bacterial diseases cause devastating losses in *Phalaenopsis* production because of the high temperature and humidity inside the greenhouse. *Phalaenopsis* will have the ability to bloom only if going through a period of juvenile phase, but it take three to four years. Cultivation cost and attrition rate are go to increase, and reduce the competitiveness of the *Phalaenopsis* industry. Those problems and dilemma need to be resolved urgently. In this study, particle gene gun-mediated transformation and the *Agrobacterium*-mediated transformation of the *Phalaenopsis* were employed, and the expression of the target genes was under the control of *alc* system (ethanol-inducible expression system, including the transcription factor *AlcR* and the promoter *AlcA*). Two sets of gene transformation had been conducted include: 1. The *alc* system (*AlcR*, *AlcA*) and *cecB-lys* genes had been transformed into the *Phalaenopsis* chloroplast genome by gene gun method. 2. *Dendrobium nobile* vernalization-related genes (*VRN1*, *AGL19*) and the *alc* system (*AlcR*, *AlcA*) were co-transformed into the *Phalaenopsis* nuclear genome by *Agrobacterium* method. Regenerated plantlets were selected by antibiotics (D-alanine or BASTA<sup>®</sup>), and finally transplanted into pot and grown in greenhouse. The results of PCR analysis of putative transgenic plants indicated that

- 
- 1) Student in M.S. Program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.
  - 2) Associate Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.
  - 3) Research Assistant, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.
  - 4) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.

the *AlcR*, *cecB*, *lys* genes were presented in the chloroplast genome of transformed *Phalaenopsis* plants, as well as *AlcR*. *VRN1*, and *AGL19* genes were presented in the nuclear genome of transformed *Phalaenopsis* plants. Only the *lys*, *AGL19* mRNA could be detected in the transformed *Phalaenopsis* plants.