

## 調節花期基因轉殖至蝴蝶蘭之研究

吳 柏 緯<sup>1)</sup> 潘 怡 君<sup>2)</sup> 陳 良 築<sup>3)</sup> 曾 夢 蛟<sup>4)</sup>

關鍵字：蝴蝶蘭、調節花期相關基因、基因轉殖

**摘要：**本研究分為兩個農桿菌轉殖法組合，分別是組合一：共同轉殖 pCAM1301-Ubi-AP1 及 pCAM1301-Ubi-PaSOC1 到 *PaFT* 基因轉型之'SPM313'蝴蝶蘭；組合二：共同轉殖 p1390-35S-PhaCOL-OCS 及 p1390-35S-PhaGI-his 到 *PaFT* 基因轉型之'SPM313'蝴蝶蘭。本研究之目的為以基因轉殖技術開發出調控蝴蝶蘭花期的技術及探討提早開花之高品質轉殖蝴蝶蘭品系之可行性。本研究已完成兩組以農桿菌法共同轉殖基因到蝴蝶蘭擬原球體(PLB)，並分別以 hygromycin 持續篩選培植體，已獲得成功轉殖之蝴蝶蘭植株。進行 PCR 分析擬轉殖蝴蝶蘭植株之結果顯示，目標、篩選及報導基因包括，組合一：*PaFT*、*API*、*PaSOC1*、*GUS*、*hptII*；組合二：*PaFT*、*COL*、*GI*、*GUS*、*hptII*，已成功轉入蝴蝶蘭基因組中。進行 RT-PCR 分析擬轉殖蝴蝶蘭植株之結果顯示，組合一 (*PaFT*、*API*、*PaSOC1*、*GUS*)及組合二 (*PaFT*、*COL*、*GI*、*GUS*、*hptII*)均可偵測到其 mRNA。本研究初步的結果顯示以基因轉殖技術開發調控蝴蝶蘭花期的技術是具有潛力的前瞻科技。

### 前 言

蝴蝶蘭(*Phalaenopsis orchid*)為多年生的附生草本植物，為單莖蘭 (monopodial orchid)，屬於單子葉植物 (monocotyledon)。植株莖部持續向上生長，不易產生分枝，沒有假球莖，具有氣生根。臺灣以蝴蝶蘭聞名國際，蝴蝶蘭盆花在國際花卉市場有著極高的商業價值。臺灣蝴蝶蘭之切花、瓶苗及盆花於 2020 年的出口總金額，達 1.32 億美元，佔台灣花卉出口總額約 21% (行政院農業委員會「農產貿易統計查詢系統」)。蝴蝶蘭因種類

- 
- 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教授。
  - 3) 國立中興大學分子生物學研究所教授。
  - 4) 國立中興大學園藝系教授，通訊作者。

繁多且型態特殊，不論在亞洲、美洲或歐洲，蘭花產業皆持續擴展，但花卉市場變化萬千，傳統育種方法極為耗時，通常需要 5-7 年。

蘭花產業為台灣花卉發展的重要命脈，然而蝴蝶蘭太長幼年期為阻礙台灣蘭花產業生級及發展的重大問題之一，亦是面對國際蘭花產業產銷及競爭所須突破的瓶頸。蝴蝶蘭的開花通常受環境信號的影響，例如溫度（春化作用）、光週期和由遺傳因素控制的內源性發育程序（幼年性），這在許多開花植物物種中很常見。蝴蝶蘭花的開花一般可分為花的過渡期和花的發育期兩個步驟。在花卉過渡期中，幼年、環境到涼爽的溫度和/或光週期對於確定蘭花在個體發育和季節方面開始開花的時間至關重要 (Wang *et al.*, 2019)。

透過阿拉伯芥的研究已知 *FT* 為最為人知的開花素 (florigen)，根據過去研究已知 *FT* 基因最主要表現於葉片組織，透過植物韌皮部運輸後移至莖頂分生組織和 *FD* 相互作用，調控 MADS-box 基因 *SOC1* 表現 (Turck *et al.*, 2008)。因為 *SOC1* 為阿拉伯芥中相當重要的開花整合基因，能夠調控 *FUL* 和 *LFY* 等基因表現促使莖頂分生組織開始轉變成花器分生組織。此外，*FT* 除了能夠調控 *SOC1* 基因表現外，同時也能夠促使另外的開花基因如 *SEP3* (*SEPALATA 3*) 和 *API* 等表現 (Kim *et al.*, 2009)，所以也能夠促使花器分生組織形成，所以當 *FT* 和 *SOC1* 開始表現時便能夠促使植物開花。

光週期誘導開花途徑中 *GIGANTEA* (*GI*) 基因主要控制植物生理韻律、晝夜及開花時間的關鍵因子。*GI* 會調控轉錄因子 *CONSTANS* (*CO*) (*COL*, *CO-Like*) 而啟動開花基因 *FLOWERING LOCUS T* (*FT*)，使植物進入生殖生長階段。有研究報告指出，光週期途徑相關基因 (*CO*、*GI*) 的表現與一些蘭科植物，蝴蝶蘭 (羅，2011)、文心蘭 (張，2009)、嘉德麗雅 (柯，2015)、鵝石斛蘭 (Kaewphalug *et al.*, 2017)、墨蘭 (羅，2011) 等的縮短幼年期及提早開花有密切的關係。

因此，本研究選取已選殖出的 *PaFT* 與 *PaSOC1* 開花整合基因、*API* 促進開花因子基因、*PhaGI* 與 *PhaCOL* 光週期相關基因等重要調節開花之相關基因，並已構築相關之轉殖載體，進行農桿菌法基因轉殖。本研究之目的為以基因轉殖技術開發出調控蝴蝶蘭花期的技術及探討培育成提早開花之高品質轉殖蝴蝶蘭品系之可行性。

## 材料與方法

### 一、試驗材料

本試驗以 *PaFT* 基因轉型之蝴蝶蘭 *Phalaenopsis Sogo Yukidian* 'SPM313' 擬原球體 (Protocorm-like body, PLB) (來自中興大學分子生物學研究所陳良築老師實驗室) 做為基因轉殖的材料。PLB 再生培養基 T2 成分為：3.5g·L<sup>-1</sup> 花寶一號、20g·L<sup>-1</sup> 地瓜、25g·L<sup>-1</sup> 香蕉、1g·L<sup>-1</sup> Tryptone、1g·L<sup>-1</sup> Peptone、0.1g·L<sup>-1</sup> Citric acid、20g·L<sup>-1</sup> Sucrose、1g·L<sup>-1</sup> Charcoal、3g·L<sup>-1</sup> Phytigel。生長環境為溫度 25°C、光週期 16 小時。

## 二、試驗方法

### (一) 農桿菌基因轉殖方法及轉殖組合

#### 1. 農桿菌轉殖組合

##### (1) 組合一：

p1301-Ubi-AP1 及 p1301-Ubi-SOC1 共同轉殖入 *PaFT* 基因轉型之蝴蝶蘭 *Phalaenopsis Sogo Yukidian* 'SPM313' 之擬原球體。

##### (2) 組合二：

p1390-35S-PhaCOL 及 p1390-35S-PhaGI 共同轉殖入 *PaFT* 基因轉型之蝴蝶蘭 *Phalaenopsis Sogo Yukidian* 'SPM313' 之擬原球體。

#### 2. 農桿菌轉殖流程

取農桿菌菌盤之單一菌落，接種於 LB 液態培養基 50 mL，加入抗生素（組合一：gentamycin 30 ppm 和 kanamycin 50 ppm；組合二：gentamycin 30 ppm 和 kanamycin 100 ppm），並於震盪培養箱中以 120 rpm、28°C 暗培養兩日。執行擬原球體感染前四小時加入酚類化合物 (acetosyringone, AS) 使農桿菌 vir 基因活化。將農桿菌倒入 50 mL 離心管，以 5000 rpm 於常溫下離心 10 分鐘，去除上清液，加入等量共同培養液 (MS powder 4 g·L<sup>-1</sup>、sucrose 20 g·L<sup>-1</sup>、Tryptone 0.5 g·L<sup>-1</sup>、peptone 0.5 g·L<sup>-1</sup>，pH 5.5，最後加入金鋼砂 1 g·L<sup>-1</sup>)，再加入 AS。將離心管放上震盪器將菌塊再懸浮，將擬原球體放入共培養液中，以 100 rpm，28°C 共同培養 30 分鐘。去除共培養液，將擬原球體放入裝有無菌擦手紙之玻璃培養皿中晾乾 10 分鐘，放入固體共培養基，28°C 暗培養三日。清洗步驟，以含有 400 ppm cefotaxime 之無菌水，以 10 分鐘 120 rpm 進行清洗，去除清洗液，再重複清洗 2 次。將擬原球體放入裝有無菌擦手紙之玻璃培養皿中晾乾 10 分鐘，並繼代於含有 400 ppm cefotaxime 之 T2 培養基。

#### 3. 培植體再生後進行篩選

待培植體再生約 1.5~2 個月，使用含有篩選藥劑之 T2 培養基進行篩選 (hygromycin 20 ppm)，約 1 個月，繼代於含有 cefotaxime 250 ppm 之 T2 培養基進行再生。

#### 4. 擬轉殖株之再生

篩選後將存活之培植體放入 T2 培養基，發展根系後出瓶，以無菌水苔為介質，定植於 2 吋黑色軟盆中。

### (三)、擬轉殖植株基因與表現分析

#### 1. 植物 genomic DNA 萃取

本試驗使用 Plant Genomic DNA Purification Kit (P 及 C biotechnology incorporation, Taiwan) 萃取植物 genomic DNA。秤取 0.1 g 植物組織裝於 1.5 mL 微量離心管中，放入液態氮中冷凍，取出植物組織置於研鉢中並加入適量液態氮以研杵將植物組織磨至粉狀。於研鉢中加入 400 µL Extraction Solution 以微量吸管將樣品完全吸起移至乾淨之 1.5 mL 離心管中，加入 5 µL RNaseA solution 後，震盪樣品 5~10 秒使之均勻混合。置入 65°C 水浴

槽中反應 20 分鐘，每隔 5 分鐘翻轉離心管，使樣品能夠反應完全。加入 100  $\mu$ L Precipitation Solution，來回翻轉離心管使樣品溶液混合均勻，至於冰上反應 5 分鐘。以 15000 g，4  $^{\circ}$ C 離心 5 分鐘，將上清液移至新的 1.5 mL 離心管中。加入 1.5 倍體積之 Binding Solution，以 pipetting 方式將樣品混合均勻。將 600  $\mu$ L 之以上混合液全部取出移至 Spin Column (已套上 collection tube) 中，以 15000 g，4 $^{\circ}$ C 離心 1 分鐘，去除 collection tube 中之濾液，重複至混合液過濾完。加入 600  $\mu$ L Wash Solution 清洗，以 15000 g，4 $^{\circ}$ C 離心 5 分鐘重複此步驟兩次。去除 collection tube 中之濾液，以 15000 g，4 $^{\circ}$ C 離心 3 分鐘去除殘餘酒精。丟棄 collection tube 後將 spin column 置入新的 1.5 mL 離心管中，加入 100  $\mu$ L 之 Elution Solution，靜置 2 分鐘。以 15000 g，4 $^{\circ}$ C 離心 1 分鐘將植物 genomic DNA 回收，並保存於 -20 $^{\circ}$ C 備用。

## 2. 植物總 RNA 萃取

本試驗使用 NC RNA Extraction Reagent (EBL Biotechnology, Taiwan)、DEPC 水、75 % 酒精 (以 DEPC 水進行稀釋)，以及滅菌之研鉢研杵組合。於 DNA、蛋白質和多醣的沉澱步驟：待檢測 sample 最多 100 mg，加入適量液態氮並進行研磨，於研鉢中加入 1 mL NC RNA 試劑 / 100 mg，將混合液移至 2 mL 微量離心管中，再加入 0.4 mL DEPC 水到 solution 中，並進行劇烈搖晃混合物 15 秒，之後將 sample 置於室溫等待 15 分鐘反應。進行離心，4 $^{\circ}$ C，12,000 g，15 分鐘。離心後，可見 DNA、蛋白質和大多數多醣在試管底部形成沉澱，其中 RNA 仍可溶於上清液。並將 1 mL 上清液 (佔上清液總體積的 75%) 轉移到新的微量離心管中，剩下的上清液丟棄。於總 RNA 的沉澱步驟：將 1 mL 上清液加入 1 mL isopropanol 異丙醇進行混合以利沉澱 RNA。之後將 sample 置於室溫等待 10 分鐘反應。進行離心，4 $^{\circ}$ C，12,000 g，10 分鐘。離心後 RNA 沉澱物可在試管底部形成沉澱。於 RNA 洗滌步驟：將 RNA pellet 加入 400  $\mu$ L 75 % 酒精 (v/v) (以 DEPC 水進行稀釋) 進行洗滌 RNA。進行離心，4 $^{\circ}$ C，4,000-8,000 g，3 分鐘。使用 pipette 除去酒精溶液。洗兩次。於 RNA 回溶步驟：使用 20  $\mu$ L DEPC 水回溶 RNA，儲存在 -70 $^{\circ}$ C 下。分離的 RNA 的 260/280 比例為 1.7 至 2.1，而 260/230 比例為 1.6 至 2.3。

## 結 果

一、組合一：共同轉殖 p1301-Ubi-AP1 及 p1301-Ubi-SOC1 到 *PaFT* 基因轉型之蝴蝶蘭 *Phalaenopsis Sogo Yukidian* 'SPM313' 之擬原球體。

(一)、蝴蝶蘭擬原球體之篩選、再生及增殖

將 *PaFT* 基因轉型之 'SPM313' 蝴蝶蘭 PLB 繼代於含有 150 ppm cefotaxime 及 20 ppm hygromycin 之 T2 培養基進行再生 (1A~B)，1.5~2 個月後 (圖 1C~D) 以農桿菌 pCAM1301-Ubi-AP1 及 pCAM1301-Ubi-PaSOC1 進行感染，後繼代於含有 4,000 ppm AS 之 T2 培養基，

進行 3 日的共培養 (圖 1E~F)。三日後以含有 450 ppm cefotaxime 之無菌水洗淨後，將 PLB 繼代於含有 450 ppm cefotaxime 及 30 ppm hygromycin 之 T2 培養基進行篩選 (圖 1G~H)。篩選 5-7 個月 (圖 1I~K)，PLB 成長為含有一至二片葉的小植株 (圖 1L~M)，繼續在含有 450 ppm cefotaxime 及 30 ppm hygromycin 之 T2 培養基篩選 12~15 個月後出瓶定植並移至溫室生長 (圖 1N~O)。

## (二)、蝴蝶蘭擬轉殖植株 DNA 及 mRNA 表現分析

萃取共 96 棵 p1301-Ubi-API 及 p1301-Ubi-PaSOC1 共同轉殖之擬轉殖植株葉片 DNA，進行 PCR 反應分析目標基因 *FT*、*API*、*PaSOC1*、報導基因 *GUS* 和篩選基因 *hptII*，PCR 結果如圖 2 所示。在 14 棵供試樣品中，分別在 14 棵擬轉殖植株偵測到 *PaFT* (370 bp) (圖 2A)、10 棵擬轉殖植株偵測到 *API* (534 bp) (圖 2B)、8 棵擬轉殖植株偵測到 *PaSOC1* (423 bp) (圖 2C)、14 棵擬轉殖植株偵測到 *GUS* (903 bp) (圖 2D)、14 棵擬轉殖植株偵測到 *hptII* (698 bp) (圖 2E) 等轉基因，未轉殖對照組 (CK1) 無偵測到任何基因的表現。14 棵擬轉殖植株中，編號 FAS59、FAS61、FAS77、FAS86 等共四棵擬轉殖植株，均能偵測到包含所有轉基因之 DNA 片段；其餘植株則是個別偵測到 *API* 或 *PaSOC1*，個別偵測到 *API* 之植株為編號 FAS42、FAS45、FAS48、FAS53、FAS54、FAS70，總共六棵；個別偵測到 *SOC1* 之植株為編號 FAS47、FAS63、FAS68、FAS94，總共四棵。

進一步萃取 14 棵擬轉殖植株葉片 RNA，進行 RT-PCR 分析目標基因 *FT*、*API*、*PaSOC1*、報導基因 *GUS* 和篩選基因 *hptII* 之 mRNA 是否表現，PCR 結果如圖 3 所示。在 14 棵供試樣品中，分別在 14 棵擬轉殖植株偵測到 *FT* (370 bp) (圖 3A)、10 棵擬轉殖植株偵測到 *API* (534 bp) (圖 3B)、5 棵擬轉殖植株偵測到 *PaSOC1* (539 bp) (圖 3C)、14 棵擬轉殖植株偵測到 *GUS* (903 bp) (圖 3D)、14 棵擬轉殖植株偵測到 *hptII* (698 bp) (圖 3E) 等基因之 mRNA 表現，未轉殖對照組 (CK1) 無偵測到任何基因的表現。14 棵擬轉殖植株中，編號 FAS61、FAS77、FAS86 共三棵擬轉殖植株能偵測到包含所有轉基因之 RNA 片段；其餘植株則是個別偵測到 *API* 及 *PaSOC1*，個別偵測到 *API* 之植株為編號 FAS42、FAS45、FAS48、FAS53、FAS54、FAS70，總共六棵；個別偵測到 *SOC1* 之植株為編號 FAS47、FAS63、FAS68，總共三棵。

## 二、組合二：共同轉殖 p1390-35S-PhaCOL-OCS 及 p1390-35S-PhaGI-his 到 PaFT 基因轉型之 'SPM313' 蝴蝶蘭

### (一)、蝴蝶蘭擬原球體之篩選、再生及增殖

將 PaFT 基因轉型之 'SPM313' 蝴蝶蘭 PLB 繼代於含有 150 ppm cefotaxime 及 20 ppm hygromycin 之 T2 培養基 (4A~B)，以農桿菌 p1390-35S-PhaCOL-OCS 及 p1390-35S-PhaGI-his 進行感染後繼代於含有 4,000 ppm AS 之 T2 培養基進行三日的共培養 (圖 4C~D)，三日後以含有 450 ppm cefotaxime 之無菌水洗淨後，將 PLB 繼代於含有 450 ppm cefotaxime 及 30 ppm hygromycin 之 T2 培養基進行篩選 5-7 個月 (圖 4E~F)，PLB 成長為含有一至二片葉的小植株 (圖 4I~K)，繼續在含有 450 ppm cefotaxime 及 30 ppm hygromycin 之 T2 培

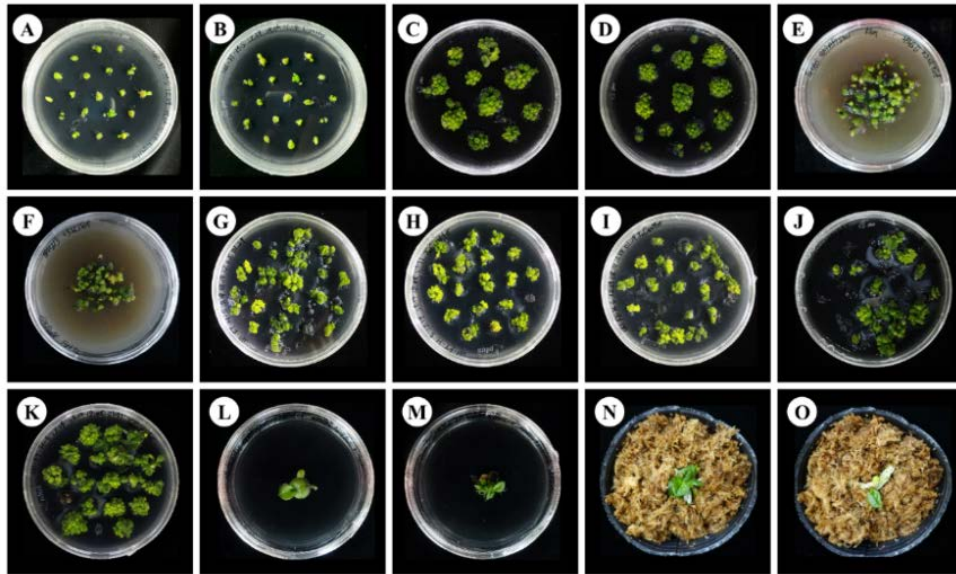


圖 1. 農桿菌法共同轉殖 p1301-Ubi-AP1 及 p1301-Ubi-PaSOC1 之 *PaFT* 基因轉型 'SPM313' 蝴蝶蘭擬轉植株的篩選、再生及增殖之情形。(A~B) *PaFT* 基因轉型之 PLB 繼代於含有 150 ppm cefotaxime 及 20 ppm hygromycin 之 T2 培養基。(C~D) *PaFT* 基因轉型之 PLB 繼代於含有 150 ppm cefotaxime 及 20 ppm hygromycin 之 T2 培養基 1.5~2 個月後。(E~F) 農桿菌轉殖後繼代於含有 4000 ppm AS 之 T2 培養基進行 3 日的共培養。(G~I) 轉殖後將 PLB 繼代於含有 450 ppm cefotaxime 及 30 ppm hygromycin 之 T2 培養基進行篩選。(J~K) PLB 轉殖後於含有 450 ppm cefotaxime 及 30 ppm hygromycin 之 T2 培養基篩選 5~7 個月，PLB 長成小植株。(L~M) PLB 轉殖後於含有 450 ppm cefotaxime 及 30 ppm hygromycin 之 T2 培養基篩選 12~15 個月後出瓶。(N~O)定植並移至溫室生長。

Fig. 1. Selection, regeneration and proliferation of *PaFT* gene transformed *Phalaenopsis Sogo Yukedian* 'SPM313' via *Agrobacterium* mediated co-transformation of pCAM1301-Ubi-AP1 and pCAM1301-Ubi-PaSOC1. (A~B) The *PaFT* gene transformed *Phalaenopsis Sogo Yukedian* 'SPM313' PLBs were cultivated in T2 medium containing 150 ppm cefotaxime and 20 ppm hygromycin. (C~D) The *PaFT* gene transformed *Phalaenopsis Sogo Yukedian* 'SPM313' PLBs were cultivated in T2 medium containing 150 ppm cefotaxime and 20 ppm hygromycin for 1.5 to 2 months. (E~F) After inoculation with *Agrobacterium*, PLBs were cultivated in T2 medium containing 400 ppm AS for 3 days of co-cultivation. (G~I) The PLBs were cultivated in T2 medium containing 450 ppm cefotaxime and 30 ppm hygromycin for selection of transformed PLBs. (J~K) After five to seven months of selection, shoots emerged from survival PLBs. (L~M) After twelve to fifteen months of selection, putative transformed plantlets were regenerated. (N~O) Putative transformed seedlings were transferred to pot and grown in greenhouse.

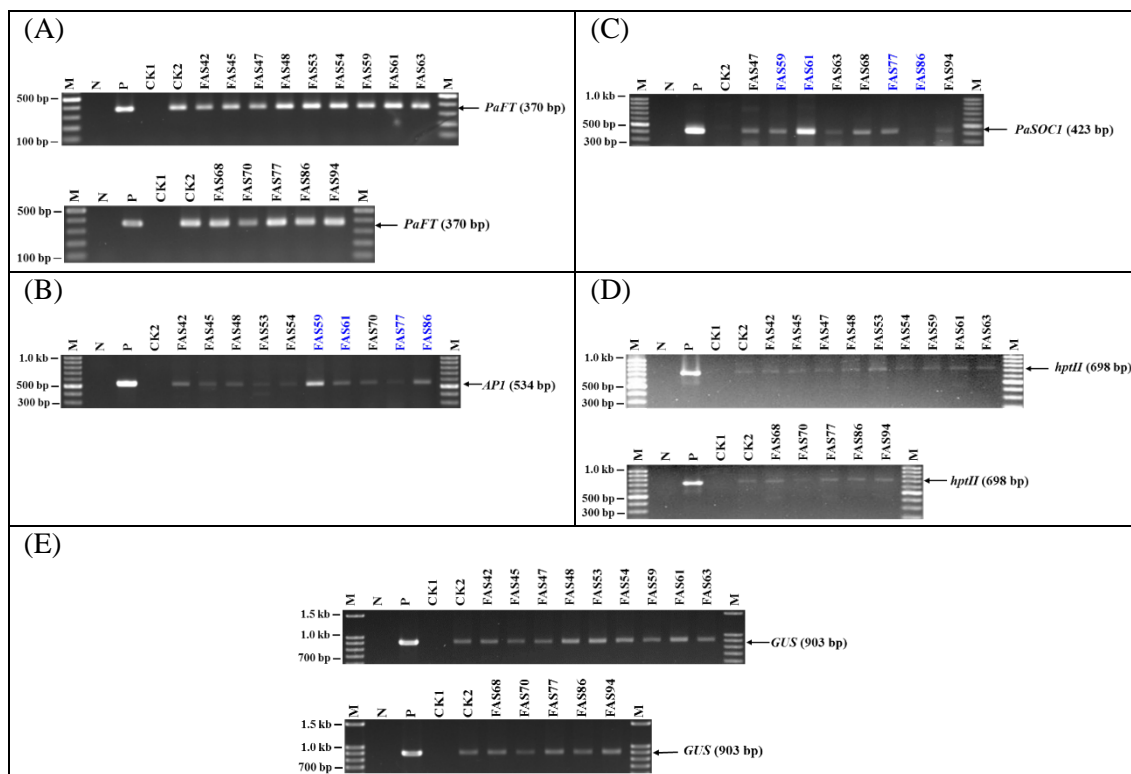


圖 2. 共同轉殖 pCAM1301-Ubi-API 及 pCAM1301-Ubi-PaSOC1 之 *PaFT* 基因轉型 'SPM313' 蝴蝶蘭擬轉植株葉片，經 PCR 分析 *PaFT* (A)、*API* (B)、*PaSOC1* (C)、*hptII* (D)、*GUS* (E) 基因之情形。CK：未轉殖植株。FAS：擬轉殖植株。CK1：'SPH41D' 蝴蝶蘭之未轉殖植株。CK2：*PaFT* 基因轉型 'SPM313' 蝴蝶蘭之未轉殖植株。P (Positive)：plasmid。N (Negative)：H<sub>2</sub>O。M：M.W. marker。藍色標記：擬轉殖植株可同時偵測到 *API* 及 *PaSOC1* 基因。

Fig. 2. PCR analysis of *PaFT* (A), *API* (B), *PaSOC1* (C), *hptII* (D), and *GUS* (E) gene fragments in putative transformed plants of *PaFT* gene transformed *Phalaenopsis Sogo Yakedian* 'SPM313' via *Agrobacterium* mediated co-transformation of pCAM1301-Ubi-API and pCAM1301-Ubi-PaSOC1. FAS: putative transgenic plants. CK1: untransformed plants of *Phalaenopsis* 'SPH41D'. CK2: untransformed plants of *PaFT* gene transformed *Phalaenopsis Sogo Yakedian* 'SPM313'. P (Positive): plasmid. N (Negative): H<sub>2</sub>O. M: M.W. marker. Blue mark: Both *API* and *PaSOC1* genes can be detected in the same putative transformed plant.

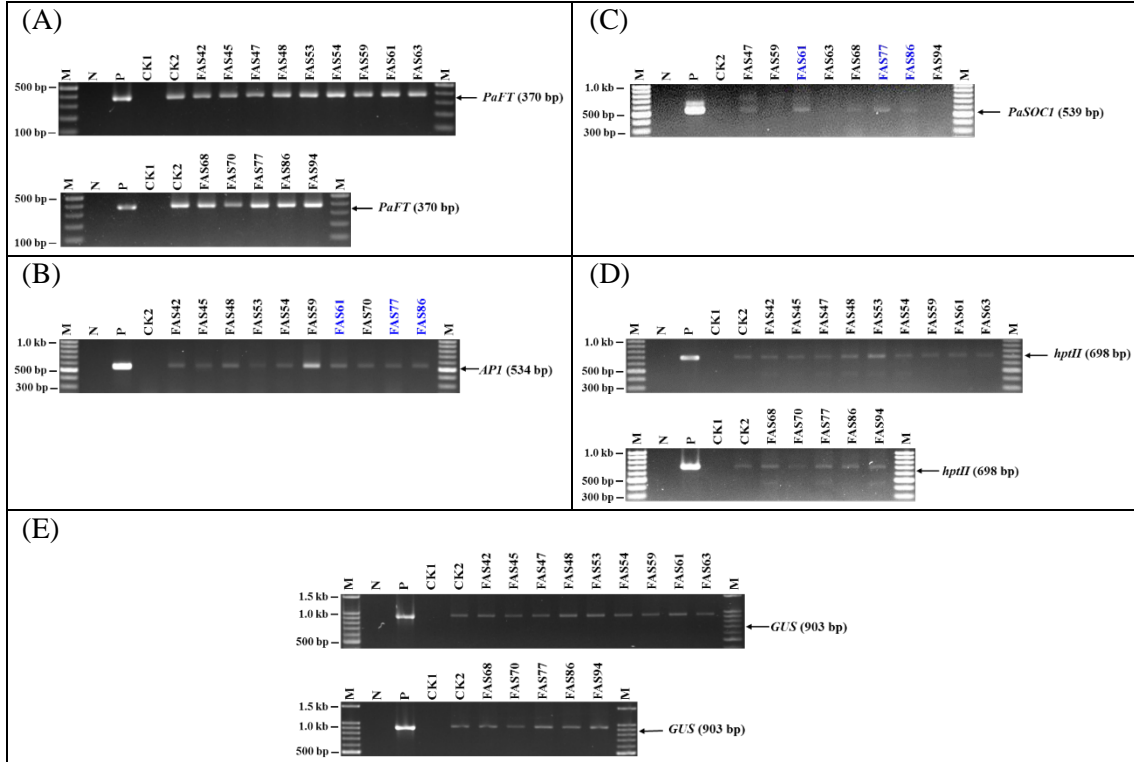


圖 3. 共同轉殖 pCAM1301-Ubi-API 及 pCAM1301-Ubi-PaSOC1 之 *PaFT* 基因轉型 'SPM313' 蝴蝶蘭擬轉植株葉片，經 RT-PCR 分析 *PaFT* (A)、*API* (B)、*PaSOC1* (C)、*hptII* (D)、*GUS* (E) mRNA 之情形。CK：未轉殖植株。FAS：擬轉殖植株。CK1：'SPH41D' 蝴蝶蘭之未轉殖植株。CK2：*PaFT* 基因轉型 'SPM313' 蝴蝶蘭之未轉殖植株。P (Positive)：plasmid。N (Negative)：H<sub>2</sub>O。M：M.W. marker。藍色標記：擬轉殖植株可同時偵測到 *API* 及 *PaSOC1* mRNA。

Fig 3. RT-PCR analysis of *PaFT* (A), *API* (B), *PaSOC1* (C), *hptII* (D), and *GUS* (E) mRNA fragments in putative transformed plants of *PaFT* gene transformed *Phalaenopsis Sogo Yukedian* 'SPM313' via *Agrobacterium* mediated co-transformation of pCAM1301-Ubi-API and pCAM1301-Ubi-PaSOC1. FAS: putative transgenic plants. CK1: untransformed plants of *Phalaenopsis* 'SPH41D'. CK2: untransformed plants of *PaFT* gene transformed *Phalaenopsis Sogo Yukedian* 'SPM313'. P (Positive): plasmid. N (Negative): H<sub>2</sub>O. M: M.W. marker. Blue mark: Both *API* and *PaSOC1* mRNA can be detected in the same putative transformed plant.



養基篩選 12~15 個月後出瓶定植並移至溫室生長 (圖 4L~O)。

(二)、蝴蝶蘭擬轉殖植株 DNA 及 mRNA 表現分析

共萃取 109 棵 p1301-Ubi-FT、p1390-35S-PhaCOL、p1390-35S-PhaGI 共同轉殖之擬轉殖植株葉片 DNA，進行 PCR 反應，分析目標基因 *FT*、*PhaCOL*、*PhaGI*、篩選基因 *hptII* 和報導基因 *GUS*，PCR 結果如圖 5 所示。在 16 棵供試樣品中，分別在 16 棵擬轉殖植株偵測到 *FT* (370 bp) (圖 5A)、10 個擬轉殖植株偵測到 *PhaCOL* (1000 bp) (圖 5B)、13 棵擬轉殖植株偵測到 *PhaGI* (1294 bp) (圖 5C)、16 棵擬轉殖植株偵測到 *hptII* (698 bp) (圖 5D)、16 棵擬轉殖植株偵測到 *GUS* (903 bp) (圖 5E)等轉基因，未轉殖對照組(CK)則無法偵測到任何基因的表現。16 棵擬轉殖植株之中，編號 FCG55、FCG60、FCG78、FCG80、FCG90、FCG96、FCG105 共七棵擬轉殖植株能偵測到包含所有轉基因之 DNA 片段；其餘植株則是個別偵測到 *PhaCOL* 及 *PhaGI*，個別偵測到 *PhaCOL* 之植株為編號 FCG56、FCG63、FCG81，總共三棵；個別偵測到 *PhaGI* 之植株為編號 FCG60、FCG69、FCG87、FCG99、FCG103、FCG109，總共六棵。

進一步萃取 16 棵擬轉殖植株葉片 RNA，進行 RT-PCR 分析目標基因 *FT*、*PhaCOL*、*PhaGI*、篩選基因 *hptII* 和報導基因 *GUS* 之 mRNA 是否表現，PCR 結果如圖 6 所示。在 16 棵供試樣品中，分別在 16 棵擬轉殖植株偵測到 *FT* (370 bp) (圖 6A)、10 棵擬轉殖植株偵測到 *PhaCOL* (683 bp) (圖 6B)、13 棵擬轉殖植株偵測到 *PhaGI* (690 bp) (圖 6C)、16 棵擬轉殖植株偵測到 *hptII* (698 bp) (圖 6D)、16 棵擬轉殖植株偵測到 *GUS* (903 bp) (圖 6E)等基因之 mRNA 表現。16 棵擬轉殖植株之中，編號 FCG 55、FCG 60、FCG 78、FCG 80、FCG 90、FCG 96、FCG 105 共七棵擬轉殖植株能偵測到包含所有轉基因之 RNA 片段；其餘植株則是個別偵測到 *PhaCOL* 及 *PhaGI*，個別偵測到 *PhaCOL* 之植株為編號 FCG56、FCG63、FCG81，總共三棵；個別偵測到 *PhaGI* 之植株為編號 FCG60、FCG69、FCG87、FCG99、FCG103、FCG109，總共六棵。

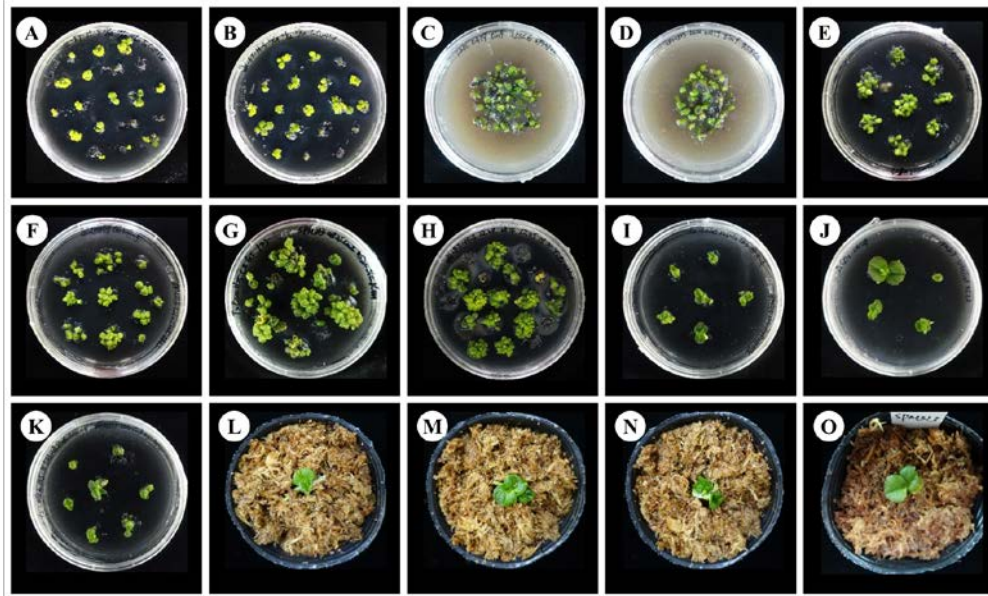


圖 4. 農桿菌法共同轉殖 p1390-35S-PhaCOL-OCS 及 p1390-35S-PhaGI-his 之 *PaFT* 基因轉型 'SPM313' 蝴蝶蘭擬轉植株的篩選、再生及增殖之情形。(A~B) *PaFT* 基因轉型之 PLB 繼代於含有 150 ppm cefotaxime 及 20 ppm hygromycin 之 T2 培養基。(C~D) 農桿菌轉殖後繼代於含有 4000 ppm AS 之 T2 培養基進行 3 日的共培養。(E~F) 轉殖後將 PLB 繼代於含有 450 ppm cefotaxime 及 30 ppm hygromycin 之 T2 培養基進行篩選。(G~H) PLB 轉殖後於含有 450 ppm cefotaxime 及 30 ppm hygromycin 之 T2 培養基篩選 5~7 個月，PLB 長成小植株。(I~K) PLB 轉殖後於含有 450 ppm cefotaxime 及 30 ppm hygromycin 之 T2 培養基篩選 12~15 個月後出瓶。(L~O) 定植並移至溫室生長。

Fig. 4. Selection, regeneration and proliferation of *PaFT* gene transformed *Phalaenopsis Sogo Yukedian* 'SPM313' via *Agrobacterium* mediated co-transformation of p1390-35S-PhaCOL-OCS and p1390-35S-PhaGI-his. (A~B) The *PaFT* gene transformed *Phalaenopsis Sogo Yukedian* 'SPM313' PLBs were cultivated in T2 medium containing 150 ppm cefotaxime and 20 ppm hygromycin. (C~D) After inoculation with *Agrobacterium*, PLBs were cultivated in T2 medium containing 400 ppm AS for 3 days of co-cultivation. (E~F) The PLBs were cultivated in T2 medium containing 450 ppm cefotaxime and 30 ppm hygromycin for selection of transformed PLBs. (G~H) After five to seven months of selection, shoots emerged from survival PLBs. (I~K) After twelve to fifteen months of selection, putative transformed plantlets were regenerated. (L~O) Putative transformed seedlings were transferred to pot and grown in greenhouse.

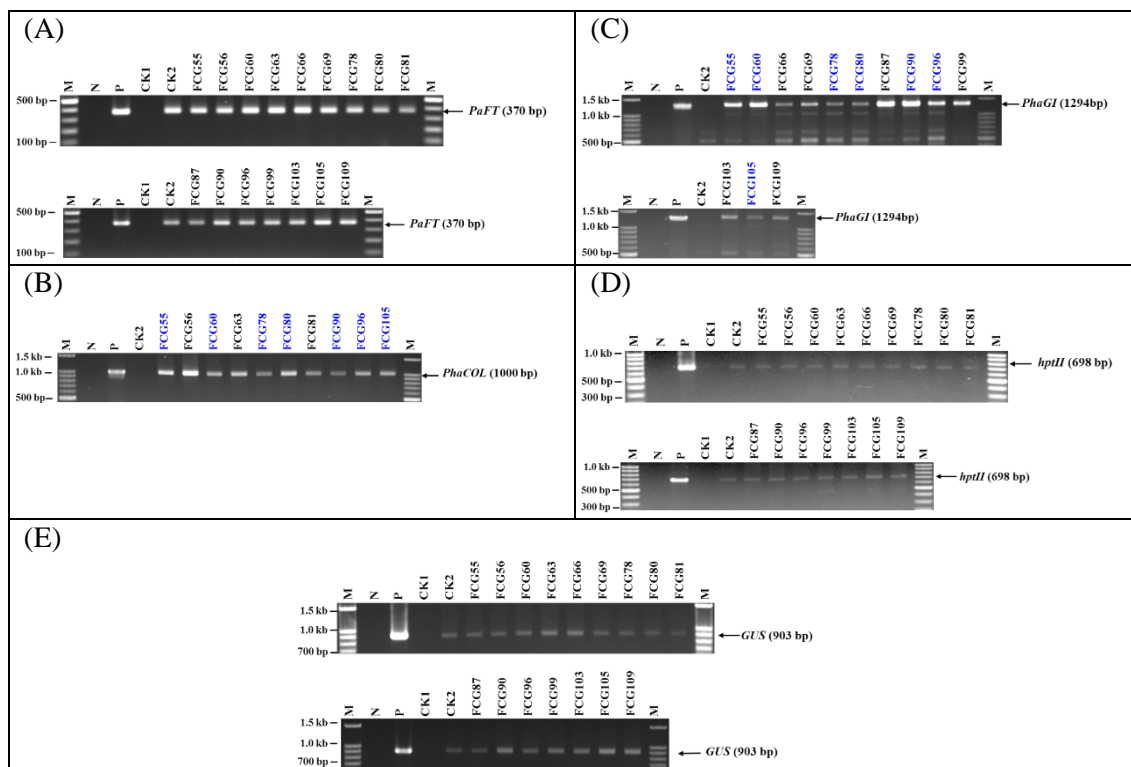


圖 5. 共同轉殖 p1390-35S-PhaCOL-OCS 及 p1390-35S-PhaGI-his 之 *PaFT* 基因轉型 'SPM313' 蝴蝶蘭擬轉植株葉片，經 PCR 分析 *PaFT* (A)、*PhaCOL* (B)、*PhaGI* (C)、*hptII* (D)、*GUS* (E) 基因之情形。CK：未轉殖植株。FCG：擬轉殖植株。CK1：'SPH41D' 蝴蝶蘭之未轉殖植株。CK2：*PaFT* 基因轉型 'SPM313' 蝴蝶蘭之未轉殖植株。P (Positive)：plasmid。N (Negative)：H<sub>2</sub>O。M：M.W. marker。藍色標記：擬轉殖植株可同時偵測到 *PhaCOL* 及 *PhaGI* 基因。

Fig. 5. PCR analysis of *PaFT* (A), *PhaCOL* (B), *PhaGI* (C), *hptII*(D), and *GUS* (E) gene fragments in putative transformed plants of *PaFT* gene transformed *Phalaenopsis Sogo Yukedian* 'SPM313' via *Agrobacterium* mediated co-transformation of p1390-35S-PhaCOL-OCS and p1390-35S-PhaGI-his. FCG: putative transgenic plants. CK1: untransformed plants of *Phalaenopsis* 'SPH41D'. CK2: untransformed plants of *PaFT* gene transformed *Phalaenopsis Sogo Yukedian* 'SPM313'. P (Positive): plasmid. N (Negative): H<sub>2</sub>O. M: M.W. marker. Blue mark: Both *PhaCOL* and *PhaGI* genes can be detected in the same putative transformed plant.

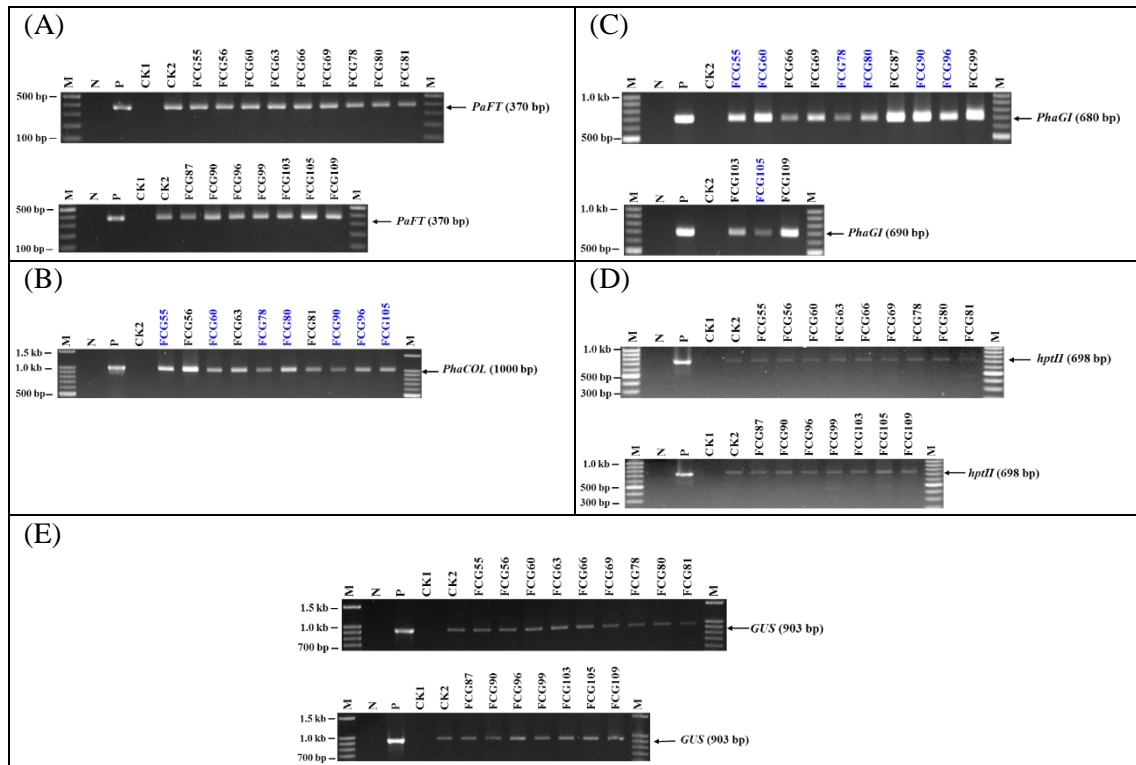


圖 6. 共同轉殖 p1390-35S-PhaCOL-OCS 及 p1390-35S-PhaGI-his 之 *PaFT* 基因轉型 'SPM313' 蝴蝶蘭擬轉植株葉片，經 RT-PCR 分析 *PaFT* (A)、*PhaCOL* (B)、*PhaGI* (C)、*hptII* (D)、*GUS* (E) mRNA 之情形。CK：未轉殖植株。FCG：擬轉殖植株。CK1：'SPH41D' 蝴蝶蘭之未轉殖植株。CK2：*PaFT* 基因轉型 'SPM313' 蝴蝶蘭之未轉殖植株。P (Positive)：plasmid。N (Negative)：H<sub>2</sub>O。M：M.W. marker。藍色標記：擬轉殖植株可同時偵測到 *PhaCOL* 及 *PhaGI* mRNA。

Fig. 6. RT-PCR analysis of *PaFT* (A), *PhaCOL* (B), *PhaGI* (C), *hptII*(D), and *GUS* (E) gene fragments in putative transformed plants of *PaFT* gene transformed *Phalaenopsis Sogo Yukedian* 'SPM313' via *Agrobacterium* mediated co-transformation of p1390-35S-PhaCOL-OCS and p1390-35S-PhaGI-his. FCG: putative transgenic plants. CK1: untransformed plants of *Phalaenopsis* 'SPH41D'. CK2: untransformed plants of *PaFT* gene transformed *Phalaenopsis Sogo Yukedian* 'SPM313'. P (Positive): plasmid. N (Negative): H<sub>2</sub>O. M: M.W. marker. Blue mark: Both *PhaCOL* and *PhaGI* mRNA can be detected in the same putative transformed plant.

## 討 論

本研究之組合一及組合二以農桿菌法共同轉殖基因到 *PaFT* 基因轉型之'SPM313'蝴蝶蘭之擬原球體，以兩種轉殖組合且每個組合包含兩種農桿菌菌系，期望於蝴蝶蘭內改變開花基因途徑以達到調控開花之目的。為了避免嵌合體植株的產生，直至出瓶前都以適當之篩選培養基持續篩選，確保轉殖成功。

### 一、擬轉殖植株之基因及 mRNA 表現分析

(一)、共同轉殖 pCAM1301-Ubi-API 及 pCAM1301-Ubi-PaSOC1 到 *PaFT* 基因轉型之'SPM313'蝴蝶蘭 (組合一)

在 14 棵擬轉植株中，編號 FAS59、FAS61、FAS77、FAS86 轉植株於 PCR 試驗中可成功偵測到 *API* 和 *SOC1* 兩個基因，其餘植株則是個別偵測到 *API* 及 *SOC1* 基因。全部植株皆偵測到 *PaFT*、*GUS* 及 *hptII* 基因，另外共有 10 棵植株偵測到 *API* 基因，八棵植株偵測到 *SOC1* 基因。在 RT-PCR 試驗中可成功偵測到 *PaFT*、*API*、*GUS* 及 *hptII* 之 mRNA，而 *SOC1* 只有在編號 FAS47、FAS61、FAS68、FAS77 及 FAS86 共五棵偵測到 mRNA。

(二)、共同轉殖 p1390-35S-PhaCOL-OCS 及 p1390-35S-PhaGI-his 到 *PaFT* 基因轉型之'SPM313'蝴蝶蘭 (組合二)

在 16 棵擬轉植株中，編號 FCG55、FCG60、FCG78、FCG80、FCG90、FCG96、FCG105 轉植株於 PCR 試驗中可成功偵測到 *COL* 和 *GI* 兩個基因，其餘植株則是個別偵測到 *COL* 及 *GI* 基因。全部植株皆偵測到 *PaFT*、*GUS* 及 *hptII* 基因，另外共有 10 棵植株偵測到 *COL* 基因、13 棵植株偵測到 *GI* 基因。在 RT-PCR 試驗中可成功偵測到 *PaFT*、*COL*、*GI*、*GUS* 及 *hptII* 之 mRNA。共有七棵植株同時偵測到 *PaFT*、*COL*、*GI*、*GUS* 及 *hptII*，分別是編號 FCG55、FCG60、FCG78、FCG80、FCG90、FCG96 及 FCG105。

### 二、結論

本研究共計已完成 1. 共同轉殖 pCAM1301-Ubi-API 及 pCAM1301-Ubi-PaSOC1 到 *PaFT* 基因轉型之'SPM313'蝴蝶蘭、2.p1390-35S-PhaCOL-OCS 及 p1390-35S-PhaGI-his 到 *PaFT* 基因轉型之'SPM313'蝴蝶蘭等兩種組合之農桿菌感染蝴蝶蘭 PLB、篩選、再生、增殖、出瓶。擬轉植株 PCR 分析之結果顯示，*PaFT*、*API*、*SOC1*、*COL*、*GI*、*GUS*、*hptII* 等轉基因共同或單一存在於轉殖葉片之基因組內；擬轉植株 RT-PCR 分析之結果顯示，*PaFT*、*API*、*SOC1*、*COL*、*GI*、*GUS*、*hptII* 等轉基因共同或單一存在於擬轉植株葉片中表現其 mRNA。

## 參考文獻

- 行政院農業委員會。2020。農產貿易統計查詢系統。< <https://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/trade/tradereport.aspx>>。
- 柯玟亘。2015。探討蝴蝶蘭及嘉德麗雅蘭中 *CONSTANS-Like* 基因調控開花時間及花器發育之特性與功能性分析。國立中興大學生物科技學研究所博士論文。台中。
- 張玉雲。2009。植物花朵發育及開花時間相關基因之研究。國立中興大學生物科技學研究所博士論文。台中。
- 魏華、王岩、劉寶輝、王雷。2018。植物生物鐘及其調控生長發育的研究進展。植物學報。53:456-467。
- 羅小燕。2011。朵麗蝶蘭成花‘溫敏現象’相關基因 *GIGANTEA* 的克隆與表達分析。浙江農林大學碩士論文。杭州。
- Kaewphalug, W., P. S. Huehne, and A. Sriboonlert. 2017. Characterization of a *CONSTANS-like* gene from pigeon orchid (*Dendrobium crumenatum* Swartz) and its expression under different photoperiod conditions. *The Hort. J.* 86: 252-262.
- Kim, D. H., M. R. Doyle, S. Sung, and R. M. Amasin. 2009. Vernalization: winter and the timing of flowering in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 25: 277-299.
- Turck, F., F. Fornara, and G. Coupland. 2008. Regulation and identity of florigen: *FLOWERING LOCUS T* moves center stage. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 573-594.
- Wang, S. L., K. K. Viswanath, C. G. Tong, H. R. An, S. Jang, and F. C. Chen. Floral induction and flower development of orchids. 2019. *Front. Plant Sci.* 10:1258.

## Studies on Transformation of Flowering Regulation Genes into *Phalaenopsis* Orchids

Bo-Wei Wu<sup>1)</sup> I-Chun Pan<sup>2)</sup> Liang-Jwu Chen<sup>3)</sup> Menq-Jiau Tseng<sup>4)</sup>

Key words: *Phalaenopsis* orchid, Flowering regulation genes, Gene transformation

### Summary

In this study, two combinations of *Agrobacterium* mediated co-transformation were applied to *Phalaenopsis* PLB, including combination 1: co-transformation of pCAM1301-Ubi-API and pCAM1301-Ubi-PaSOC1 to *PaFT* gene transformed *Phalaenopsis Sogo Yukedian* 'SPM313' ; combination 2: co-transformation of p1390-35S-PhaCOL-OCS and p1390-35S-PhaGI-his to *PaFT* gene transformed *Phalaenopsis Sogo Yukedian* 'SPM313'. The objective of this research is to develop the innovative biotechnology for regulating flowering time in *Phalaenopsis* orchid for shorting the juvenile stage and flowering earlier, via the art of gene transformation.

Two sets of *Agrobacterium* mediated co-transformation of flowering-regulating genes had been conducted, and hygromycin was used continuously to screen the transformed explants. Several putative transgenic *Phalaenopsis* orchid plants had been successfully obtained. The results of PCR analysis showed that the target, screening and reported genes including *PaFT*, *API*, *PaSOC1*, *GUS*, *hptII* genes (combination 1), and *PaFT*, *COL*, *GI*, *GUS*, *hptII* genes (combination 2) had been successfully transferred into the genome of putative transgenic *Phalaenopsis* orchid plants. The results of RT-PCR analysis showed that all mRNAs could be detect in both combinations 1 (*PaFT*, *API*, *PaSOC1*, *GUS*) and 2 (*PaFT*, *COL*, *GI*, *GUS*, *hptII*), The preliminary results indicate that regulating flowering time of *Phalaenopsis* orchid by gene transformation has the potential for new technology foresight.

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

