

轉殖開花調控相關基因於蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis* 'SPH41D')之研究

林育聖¹⁾ 潘怡君²⁾ 董怡君³⁾
陳柏亨¹⁾ 曾夢蛟⁴⁾

關鍵字：蝴蝶蘭、農桿菌基因轉殖、開花調控相關基因

摘要：蝴蝶蘭(*Phalaenopsis*)花朵美麗、色彩繽紛且開花時間長，已成為台灣最重要的外銷經濟花卉。但因幼年性原因，蝴蝶蘭之育種時間偏長，在商業品種變化更迭迅速的現今，如何縮短、甚至調控其開花時間，是相當關鍵的課題。本研究採用農桿菌共同基因轉殖策略，導入4個開花調控相關基因 (*VRN1*、*PaSOC1*、*PaFT*、*VRN3*) 到 'SPH41D'蝴蝶蘭，期藉由誘導型啟動子(*alcR/alcA*)的操縱，獲得可調控開花時間的轉殖蝴蝶蘭。試驗結果經PCR與RT-PCR分析，轉殖植株已單獨或同時導入目標基因 *VRN1*、*PaSOC1* 與/或 *PaFT*，且成功轉殖者能夠於葉片基因組中偵測到轉基因 DNA 與 mRNA 之表達，同時轉殖成功植株之生長發育並未受到影響。

前 言

蝴蝶蘭(*Phalaenopsis* 縮寫為 *Phal.*)花形美麗、花色眾多，同時兼具型態多樣性與長的室內開花期等優異特點，現已成為世界性最重要的花卉作物之一(陳，2002；葉等，2012)。臺灣素有蝴蝶蘭王國的美名，持續不斷育成具備各類型態姿色的新品種，使蝴蝶蘭產業歷經數十載仍方興未艾，時至今日仍為我國最重要的外銷花卉，其109年外銷金額即佔同項目總額近7成，重要性不言可喻。

-
- 1) 國立中興大學園藝學系博士班研究生。
 - 2) 國立中興大學園藝學系副教授。
 - 3) 世界蔬菜中心行政助理。
 - 4) 國立中興大學園藝學系教授，通訊作者。

然蝴蝶蘭具相當幼年性，即植株須歷經一定時間的營養生長方才得以抽芽開花(蔡等，2013)，也因此導致育成新品種時間相對冗長；而現今花卉市場消費者喜好變化迅速，過長的育種時間可能侵蝕市場競爭力。又如今主流之雜交育種於執行過程，可能導入非預期之不良性狀，更加嚴重的影響育種過程之金錢、場地與時間等成本耗費。透過基因轉殖技術得以於不改變其他優良特性的情況下，快速導入單一優良性狀，能夠在縮短育種時間的同時，將特定不良性狀進行克服，達到蝴蝶蘭品種改良的目標，期盼藉以協助解決蝴蝶蘭產業面臨的問題。

目前蝴蝶蘭以基因轉殖方式，針對開花誘導相關基因進行調控之文獻報告十分少數，僅於 2012 與 2015 年均選用 *Phal. amabilis* 為目標材料，將該品種克隆出之 *FT* 相似基因 *PaFT* 導入且使之大量表現，期盼瞭解該基因對開花時間是否造成影響，但試驗結果並未提及植株開花時間相關訊息 (Mercuriani *et al.*, 2012; Semiarti *et al.*, 2015)。另有研究則採用商業品種 *Phal.* 'SPH41D' 或 *Phal.* Sogo Yukidian 'SPM313' 為材料，藉由導入多個開花誘導調控相關基因(如 *VRN1*、*AGL19*、*PaSOC1*、*PaFT*、*PhaCOL*、*PhaGI*) 觀察對植株之影響，然結果同樣未說明有無改變開花時間 (尤，2020; 吳，2021)，此外並無收集到其他相關文獻報告。本研究選用農桿菌基因轉殖策略，期盼將開花誘導調控之關鍵基因 *VRN1*、*PaSOC1*、*PaFT* 與/或 *VRN3* 導入蝴蝶蘭 'SPH41D' 中使之單一或同時表現，冀望成功完成轉殖作業之植株得以縮短幼年性、提早開花，藉以減少開花誘導所需之低溫成本，同時應用誘導型啟動子達成精準調控開花時間的目標，強化我國蝴蝶蘭產業體質。

材料與方法

一、試驗材料

(一)、轉殖植物材料製備

本試驗植物材料(*Phal.* 'SPH41D')購自三和生物科技有限公司，增殖、繼代與轉殖材料製備流程簡述如下：取單一擬原球體以鋒利刀具將其對半切割，去除頂芽與吸收毛，放置於 T2 培養基(Hyponex No.1(花寶一號) 3.5g/L、Tryptone 1g/L、Citric acid 0.1g/L、Myo-inositol 0.1g/L、Sucrose 20g/L、Sweet potato(紅肉甘藷台農 66 號) 20g/L、香蕉(新北蕉) 25g/L、pH 5.5、再加入活性碳 1 g/L、Gellan gum powder 3g/L)上，而後將切割面接觸培養基，培養環境為 25±2°C、光週期 12/12 小時(D/N)之植物組織培養室中，每 1.5-2 個月繼代一次，俟獲得足夠數量且合適大小之擬原球體後，選擇部分培植體進行切割、又經癒傷培養一週，再執行農桿菌基因轉殖之感染作業。

(二)、農桿菌基因轉殖載體

使用農桿菌菌系為 *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101)。轉殖載體簡述如下：

1. pMLBart-AlcR-AlcA-VRN1：啟動子 *AlcA*(受 *AlcR* 蛋白及乙醇調控)、目標基因選殖自

石斛蘭 *Den. To My Kids 'Smile'* 之 *VRN1*、篩選標誌基因 *bar*、由本實驗室楊舜閔學弟所構築。

2. pMLBart-AlcR-AlcA-PaSOC1：啟動子 *AlcA*(受 *AlcR* 蛋白及乙醇調控)、目標基因選殖自蝴蝶蘭之 *SOC1*、篩選標誌基因 *bar*、由國立中興大學分子生物學研究所陳良築老師提供。
3. pMLBart-AlcR-AlcA-PaFT：啟動子 *AlcA*(受 *AlcR* 蛋白及乙醇調控)、目標基因選殖自蝴蝶蘭之 *FT*、篩選標誌基因 *bar*、由國立中興大學分子生物學研究所陳良築老師提供。
4. pCAMBIA1301-35S-VRN3：啟動子 *CaMV35S*、目標基因選殖自小麥之 *VRN3*、報導基因 *gusA*、篩選標誌基因 *hptII*、由輔英科技大學生物科技系李佩芳老師提供。

二、試驗方法

(一)、農桿菌基因轉殖

在含有目標載體之農桿菌菌盤上挑選任意菌落，接種於含有適當抗生素之 LB 液態培養基中、在 28°C 黑暗環境以 100 r.p.m. 搖晃培養 2 天。於轉殖感染前 4 小時加入 200 uM 之乙酰丁香酮(acetosyringone, AS)促進活化。完成後將農桿菌菌液倒入 50 ml 離心管、並以 4°C、5,000 r.p.m. 條件離心 10 分鐘，去除上清液後再加入 20 ml 共培養液(4.4g/L MS(Murashige and Skoog, 1962)、20g/L Sucrose、200 uM AS、pH 5.5、再加入 0.1g/L 金鋼砂)，應用 vortex 振盪使之重新懸浮，作為轉殖感染液。另於轉殖作業前 7 天，將蝴蝶蘭擬原球體切除頂芽後，放置於含有 200 uM AS 之 T2 培養基預培養，作為農桿菌感染之植物材料。隨後將完成製備之培植體放入含有轉殖感染液的離心管中，以 100-150 r.p.m. 搖晃培養 30 分鐘、移除感染液於無菌擦手紙上晾乾。繼代於固態共培養培養基，放置在 28°C、黑暗環境 3 天。完成後，運用含有 500 ppm cefotaxime 之無菌水作為 Wash 液，在 150 r.p.m. 條件搖晃 10 分鐘，此步驟需重複 3 次。最後將之移動到滅菌完成且內有擦手紙的玻璃培養皿中晾乾 10 分鐘，隨後繼代至含有 500 ppm cefotaxime 之 T2 培養基。

(二)、擬轉殖植體篩選生育流程

完成農桿菌基因轉殖作業後，移置於含有 5 ppm glufosinate 與 500 ppm cefotaxime 之 T2 培養基進行為期 2 個月的篩選作業，完成後將擬轉殖培植體置於具 250 ppm cefotaxime 之 T2 培養基進行繼代再生，並於 2 個月後移去 cefotaxime，而後約每 2 個月繼代一次，俟其芽體生成且發根健壯後，接續執行出瓶相關作業。

(三)、擬轉殖植物目標基因分析

1. 擬轉殖植株 genomic DNA 萃取

本研究使用 Plant Genomic DNA Purification Kit (Biokit Biotechnology, Taiwan) 進行 DNA 萃取。將 0.1 g 之葉片組織，置於研鉢中加入適量液態氮磨至粉碎，再於研鉢中加入 400 ul Extraction Buffer，移動到 1.5 ml eppendorf 中，隨後加入 5 ul 之 RNaseA Solution，運用 vortex 振盪均勻混合；再移至 65°C 水浴環境 20 分鐘，過程中需上下翻轉一次使其混合均勻。完成後加入 100 ul Precipitation Buffer，均勻混合後置於冰上 5 分鐘，再次振盪均

質、隨後以 4°C、12,000 xg 條件離心 3 分鐘，吸取上清液移置於新的 eppendorf 中。加入 1.5 倍體積 Binding Buffer 後均勻混合。再吸取 700 ul 混合液轉移至裝設 Collection Tube 完成之 Spin Column，以 4°C、12,000 xg 離心 1 分鐘後移除 Collection Tube 內之廢液、此步驟需重複 1 次。再加入 600 ul Wash Buffer 以 4°C、12,000 xg 離心 1 分鐘後去除廢液，此步驟也需重複 1 次。完成後再以 4°C、12,000 xg 離心 5 分鐘，隨後將 Spin Column 移置入新的 1.5 ml eppendorf 中，最後加入 50 ul 之 Elution Buffer 靜置 2 分鐘，再以 4°C、12,000 xg 條件離心 1 分鐘後，將獲得之擬轉殖植株 genomic DNA 回收、並保存於-20°C 冰箱備用。

2. 聚合酶連鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)

採用 Biometra TOne Thermal Cycler (Analytik Jena, Germany)儀器進行 PCR 增幅。PCR 增幅套組方面，*VRN1*、*PaSOC1*、*PaFT*、*VRN3*、*bar*、*hptII* 與 *gus* 基因使用揚積生物科技有限公司之 EBL PCR Master Mix (2X), Red dye(EBL Biotechnology, Taiwan)，添加 12.5 ul EBL PCR Master Mix(2X)以及 1 ul 之 10 uM primer。另 *AlcR* 基因使用東洋紡株式會社之 Blend Taq Plus(Toyobo, Japan)，添加 2.5 ul 之 10x PCR buffer for Blend taq、2.5 ul 之 2 mM dNTPs 以及 0.5 ul 之 10 uM primer、0.25 ul 之 Blend taq -Plus-，再加入 1-2 ul 前述萃取完成之 DNA，最終補水至 25 ul。

PCR 增幅反應設定第一階段變性(denaturation)使用 95°C 條件、時間為 5 分鐘、共 1 循環；第二階段含初期 denaturation 同為 95°C 環境、時間為 30 秒，隨後進行之引子黏合(Annealing)溫度設定視各基因調整(如表 1)、時間也為 30 秒，而延長(extention)步驟運用 72°C、時間則依照表一之預期片段大小進行適當搭配，循環數為 35-40 個；最終第三階段的 extention、溫度條件 72°C、時間為 10 分鐘、共 1 循環。PCR 增幅反應完成後進行 DNA 凝膠電泳或貯存至 4°C 冰箱備用。

3. 乙醇誘導處理

取擬轉殖植株葉片，將其浸泡於含有 2% 乙醇之磷酸鹽緩衝生理鹽水(Phosphate Buffered Saline, PBS) (pH7.4、50mM)中，真空抽氣 5 分鐘，而後置於室溫照光環境 12 小時，再進行 RNA 萃取作業。

4. 擬轉殖植株總量 RNA(total RNA)萃取

採用 Thermo Fisher Scientific(USA)之 TRIzol™ reagent 進行擬轉殖植株總量 RNA 萃取。取經乙醇誘導後、約 0.1 g 之葉片組織，置於研鉢中加入適量液態氮磨至粉碎，再加入 1 ml TRIzol™ reagent 萃取試劑，移至 eppendorf 振盪混勻後，靜置 5 分鐘，加入 200 ul 之 chloroform，靜置 3 分鐘，隨後以 4°C、12,000 xg 條件、離心 15 分鐘，完成後小心吸取上清液移入新的 eppendorf，而後添加 500 ul 之異丙醇(isopropanol)，放置於-20°C 環境 15 分鐘，再應用 4°C、12,000 xg 離心 10 分鐘，離心後底部沉澱物即為 RNA，將液體移除後，添加以 DEPC 水稀釋至 75%之乙醇 1,000 ul，再以 4°C、7,500 xg 離心 3 分鐘，隨後將乙醇移除，最後添加 30 ul DEPC 水進行回溶，完成後貯存於-80°C 冷凍冰箱備用。

表 1. 偵測蝴蝶蘭轉殖開花調控相關基因使用的引子、黏合溫度以及預期片段之長度

Table 1. Primer sequence, annealing temperature, and predicted size for the detection of transgenes in *Phalaenopsis*.

目標基因 (Target gene)	引子 (Primer)	序列 (Sequence)	黏合溫度(°C) (Annealing temp)	預期片段 (Predicted size)
<i>VRN1</i>	VRN1 19-F	5'- CAGCTGAAGCGAATCGAGAA-3'	57°C	575 bp
	VRN1 593-R	5'- GCAGAGCTATACTGGGACAGG-3'		
<i>AlcA-PaSOC1</i>	AlcA 220-F	5'- TCCCCGCATAGCTGAACATC-3'	58°C	509 bp
	PaSOC1 451-R	5'- CTACCTGCTCTTCCAGCAAACG-3'		
<i>PaSOC1</i>	PaSOC1 1-F	5'- GCATCGGACAAACATGGTGAG-3'	55°C	539 bp
	PaSOC1 539-R	5'- AGGTTGTGTGAGGTCCTTGC-3'		
<i>AlcA-PaFT</i>	AlcA 220-F	5'- TCCCCGCATAGCTGAACATC-3'	51°C	811 bp
	TNOS 1030-R	5'- AGCATTGCGCCGCTTCTGTAAT-3'		
<i>PaFT</i>	PaFT-F	5'- TCACAAGAAGGGTTTCTCTCAGAGT-3'	59°C	370 bp
	PaFT-R	5'-CGGGTGTGAAATTTGACGCCAGC-3'		
<i>VRN3</i>	VRN3-F	5'- GGCAATGAGATGAGGACCTT-3'	54°C	328 bp
	VRN3-R	5'- CACGCTGGCAGTTGAAGTAG-3'		
<i>AlcR</i>	AlcR 1906-F	5'- TGGACAGCGAAGTACCAACC-3'	59°C	499 bp
	AlcR 2404-R	5'- CCATATCCGACTTCTGCCC-3'		
<i>bar</i>	bar 113-F	5'- AAGCACGGTCAACTTCCGTA-3'	60°C	398 bp
	bar 510-R	5'- AGAAACCCACGTCATGCCAG-3'		
<i>hptII</i>	hptII-F	5'- CTATTCTTTGCCCTCGGACG-3'	54°C	1,007 bp
	hptII-R	5'- CCGCGACGTCTGTGAGA-3'		
<i>gus</i>	GUS 452-F	5'- TGATTACCGACGAAAACGG-3'	60°C	903 bp
	GUS 1334-R	5'- AGAACATTACATTGACGCAGG-3'		
<i>PaActin</i>	PaActin-F	5'- CCCTTTATGCTAGCGGTCTGT-3'	54°C	279 bp (cDNA)
	PaActin-R	5'- AGCTGTTCTTCGAGTCTCC-3'		

5. 反轉錄聚合酶連鎖反應(Reverse Transcription PCR, RT-PCR)

採用 HiScript I™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Bionovas Biotechnology, Canada) 進行 cDNA 合成。於 PCR tube 中加入 10 ul 之 2x Fast premix、2 ul 之 Primer mix、1 ug-10 pg 之 RNA，並補充 ddH₂O 調整至體積 19 ul，而後移置於 65°C 作用 5 分鐘、再於 4°C 作用 1 分鐘。完成後加入 1 ul 之 HiScript I reverse transcriptase，置於 42°C 環境作用 30 分鐘、再運

用 85°C 作用 5 分鐘，完成後貯存於 -20°C 冷凍冰箱備用。

6. DNA 凝膠電泳

PCR 或 RT-PCR 反應完成之產物，倘未於 PCR 過程添加追蹤染劑者，取 3 ul 與適量 6 倍電泳追蹤染劑均勻混合；已添加者直接取 3 ul，移至 1.8% 之 Invitrogen™ UltraPure™ Agarose 膠體孔洞內，在 1X TAE buffer 環境中進行。完成後，將膠體移入含有 0.5 µg/ml 溴化乙錠(Ethidium Bromide, EtBr)之溶液、染色 5-10 分鐘，再移置於含有 RO 水之退染盒內 5 分鐘；或於配置 100 ml 之 agarose 膠體時，加入 5 ul 之 HealthView™ Nucleic Acid Stain 安全染劑。完成後移動到 UV 光箱(Gel logic 200 Imaging system)檢視膠體上之 DNA 或 cDNA 片段，並進行照相與影像貯存作業。

7. 轉殖植株性狀調查

於溫室栽培約 1 年半後，將完成轉殖作業之植株進行性狀調查，調查項目與定義參考蔡等(2013)之方法，分項說明如下：1. 葉片數：當最上位葉之長度大於同向下一葉之二分之一時，視為一片葉。2. 雙葉幅：垂直目視植株最大葉片展開之直線距離。3. 葉長與葉寬：以葉片之最長位置與最寬位置的長度為代表。4. 葉片厚度：葉片長度二分之一與葉緣至葉脈二分之一處之厚度為代表。

結 果

一、擬轉殖培植體之篩選、誘導增殖與再生以及出瓶培養

本試驗所選擇之 4 個轉殖載體，其中計有 pMLBart-AlcR-AlcA-VRN1、pMLBart-AlcR-AlcA-PaSOC1 與 pMLBart-AlcR-AlcA-PaFT 共 3 者帶有篩選標誌基因 *bar*，另 1 個轉殖載體 pCAMBIA1301-35S-VRN3 則具備 *hptII* 篩選標誌基因，在此之中多數載體帶有篩選標誌基因 *bar*，且 glufosinate 之篩選效率優於 hygromycin，因此選擇 glufosinate 作為篩選藥劑、濃度則運用 5 ppm 進行。選別過程未成功轉殖者可觀察到自頂芽生長點開始黃褐黑化、漸次擴展至整個培植體，且篩選時植體生長緩慢，隨著時間的推演逐漸發生死亡現象；倘轉殖成功者則能夠持續發育再生，但數量十分稀少。篩選 8 週後將 glufosinate 移除，並以 2 個月為頻度持續進行繼代培養；俟芽體萌出、葉片發育且根系生長，植株整體成長至一定大小後，移置於醬瓜瓶中。待生育至合宜尺寸，接續執行出瓶作業，出瓶標準為葉片數達 3 片且葉長約 1 公分左右，同時根數目 2-3 條且健壯時進行。種植於 2 吋黑軟盆後歷經健化馴化，移至溫室等候擬轉殖植株生長(圖 1)。

二、擬轉殖植株之目標基因分子層次表現分析

萃取擬轉殖植株葉片 DNA，經 PCR 偵測 12 棵擬轉殖植株，其中計有編號 S2、S5、S9、S10 共 4 株供試樣品能夠單獨或同時偵測到目標基因 *VRN1*(575 bp)、*PaSOC1*(509 bp) 與/或 *PaFT*(811 bp)之預期條帶位置，並於 4 棵轉殖植株均檢測到轉錄因子基因 *AlcR*(499

bp)與篩選標誌基因 *bar*(398 bp)的目標片段大小。但無法在任何擬轉殖植株中偵測到 *VRN3*、*hptII* 與 *gus* 之表達。在供試樣品編號 S5、S10 同時表現目標基因 *VRN1*(575 bp)、*PaSOC1*(509 bp)、*PaFT*(811 bp)；而編號 S9 則可以檢測到目標基因 *VRN1*(575 bp)、*PaFT*(811 bp)；另編號 S2 僅有單一目標基因 *PaFT*(811 bp)表達，且訊號十分微弱(圖 2)。

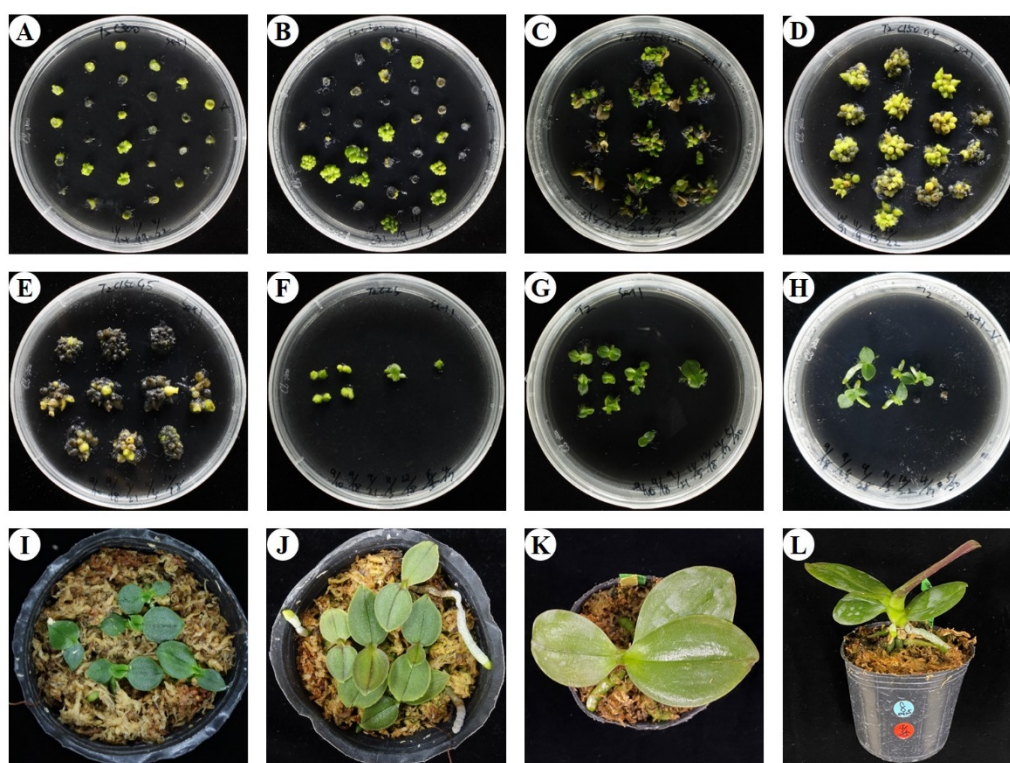


圖 1. 經農桿菌法轉殖後以 glufosinate 進行篩選之擬轉殖蝴蝶蘭(*phal.* 'SPH41D')植株，進行篩選、再生之情形。(A~B).擬轉殖培植體以 5 ppm glufosinate 進行篩選；(C~E).擬轉殖培植經 5 ppm glufosinate 篩選後黃化褐化死亡；(F~H).篩選後存活擬原球體抽芽發根持續發育；(I~L).擬轉殖植株移出定植後生育情況。

Fig. 1. Selection and regeneration of putative transformed plants of *phal.* 'SPH41D' by glufosinate via *Agrobacterium* mediated transformation. (A~B). Selection of putative transformed explants with 5 ppm glufosinate; (C~E). Putative transformed explants become white and dead after selection of 5 ppm glufosinate; (F~H). After screening, the survival PLBs were shooting, rooting and keep growing; (I~L). Putative transformed seedlings were transplants to pots and grown in greenhouse.

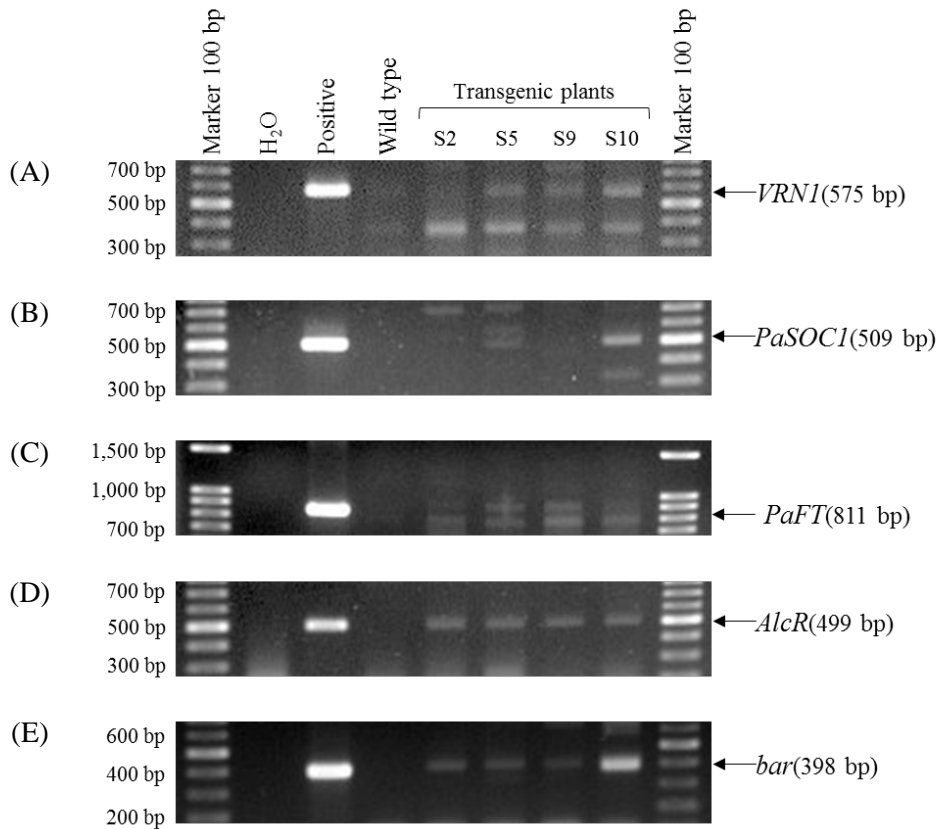


圖 2. 共同轉殖 pMLBART-AlcR-AlcA-VRN1、pMLBART-AlcR-AlcA-PaSOC1、pMLBART-AlcR-AlcA-PaFT 與 pCAMBIA1301-35S-VRN3 之蝴蝶蘭‘SPH41D’擬轉殖植株葉片 DNA，經 PCR 各別分析 *VRNI*(A)、*PaSOC1*(B)、*PaFT*(C)、*AlcR*(D)、*bar*(E) 基因目標片段表現之情形。S：擬轉殖蝴蝶蘭植株。

Fig. 2. PCR analysis of *VRNI*(A), *PaSOC1*(B), *PaFT*(C), *AlcR*(D) and *bar*(E) gene fragments in putative transformed plants of *Phal.* 'SPH41D' via *Agrobacterium* mediated co-transformation of pMLBART-AlcR-AlcA-VRN1, pMLBART-AlcR-AlcA-PaSOC1, pMLBART-AlcR-AlcA-PaFT and pCAMBIA1301-35S-VRN3. S: the putative transgenic *Phalaenopsis* plants.

接續將上述成功偵測到轉基因 DNA 者進行乙醇誘導處理，再執行 RNA 分析(圖 3)，編號 S5、S9 之葉片樣品可以檢測到目標之 *VRNI* 與 *PaFT* 基因；而 S10 則能夠偵測到目標基因 *VRNI* 與 *PaSOC1* 表現，同時 3 棵轉殖植株皆可檢測到 *AlcR* 與 *bar* 基因之 RNA 表達；但轉殖植株編號 S2 並未有任何轉基因的 mRNA 被偵測到。另 4 株轉殖蝴蝶蘭之 *PaActin* 基因 RNA 均正常表現。

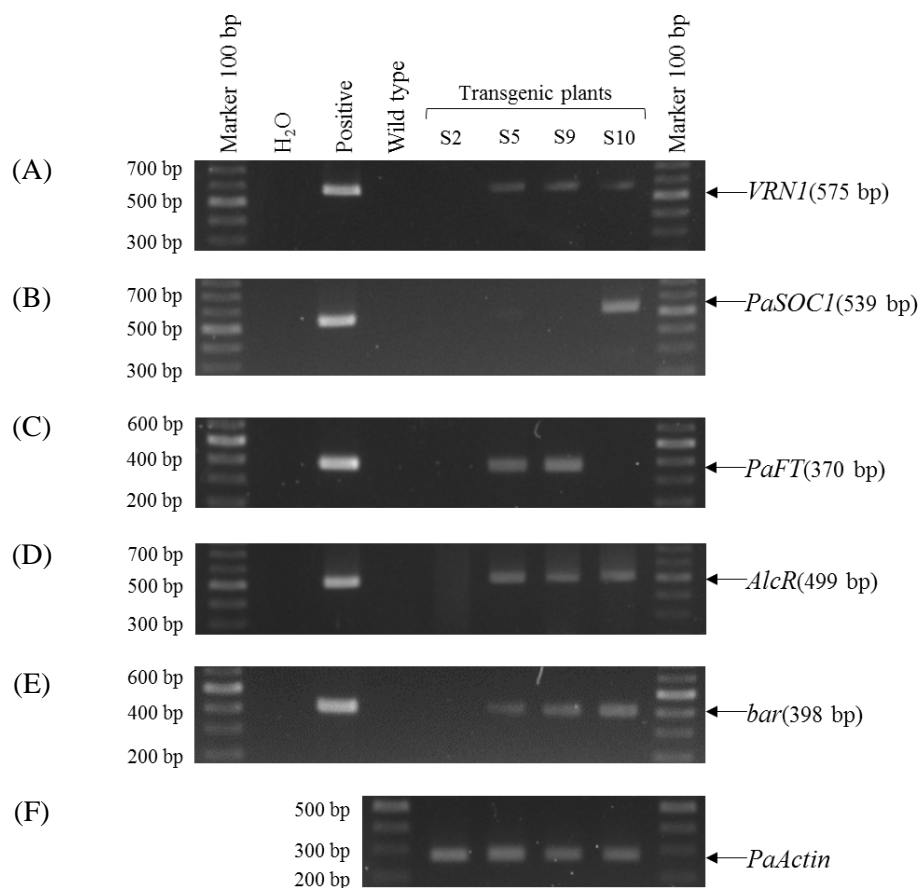


圖 3. 共同轉殖 pMLBART-AlcR-AlcA-VRN1、pMLBART-AlcR-AlcA-PaSOC1、pMLBART-AlcR-AlcA-PaFT 與 pCAMBIA1301-35S-VRN3 之蝴蝶蘭‘SPH41D’擬轉殖植株葉片 mRNA，經 PCR 各別分析 *VRN1*(A)、*PaSOC1*(B)、*PaFT*(C)、*AlcR*(D)、*bar*(E)、*PaActin*(F) 基因目標片段表現之情形。S：擬轉殖蝴蝶蘭植株。

Fig. 3. RT-PCR analysis of *VRN1*(A), *PaSOC1*(B), *PaFT*(C), *AlcR*(D), *bar*(E) and *PaActin*(F) mRNA in putative transformed plants of *Phal.* 'SPH41D' via *Agrobacterium* mediated co-transformation of pMLBART-AlcR-AlcA-VRN1, pMLBART-AlcR-AlcA- PaSOC1, pMLBART-AlcR-AlcA-PaFT and pCAMBIA1301-35S-VRN3. S : the putative transgenic *Phalaenopsis* plants.

三、轉殖植株與經轉殖未檢測到目標基因植株之性狀調查比較

將成功轉殖之 4 棵蝴蝶蘭植株與同時期進行轉殖作業但未成功者進行性狀調查後比較如表 2 所示。葉片數方面，除轉殖編號 S9 僅有 2 片葉，小於未成功轉殖者之平均值 3.5 片外，其他 3 棵轉殖植株均有 3 片葉，落在未成功轉殖植株平均值標準差中；雙葉幅

部分，僅 S2 達 10.3 公分、明顯較大，而 S5、S9 與 S10 與未成功轉殖者的平均值相近；葉片厚度區塊，絕大多數皆介於未成功轉殖植株平均值標準差之間，僅 S5 之第一葉厚度略薄；葉長葉寬項目，S2 的第一、二葉之長與寬明顯大於未成功轉殖者平均值，另 S5 的第一葉偏小外，其他多數則落在平均值標準差範疇。

表 2. 共同轉殖 pMLBART-AlcR-AlcA-VRN1、pMLBART-AlcR-AlcA-PaSOC1、pMLBART-AlcR-AlcA-PaFT 與 pCAMBIA1301-35S-VRN3 載體的蝴蝶蘭與未成功轉殖者之性狀比較

Table 2. The characters of *Phalaenopsis* transgenic plants via co-transformation of pMLBART-AlcR-AlcA-VRN1, pMLBART-AlcR-AlcA-PaSOC1, pMLBART-AlcR-AlcA-PaFT and pCAMBIA1301-35S-VRN3 was compared with nontransgenic plants.

性狀	樣品名稱				
	未成功轉殖植株平均值	S2	S5	S9	S10
葉片數(片)	3.5±0.5	3	3	2	3
雙葉幅(cm)	7.5±1.3	10.3	7.9	7.8	6.8
第一葉厚度(mm)	2.10±0.33	2.21	1.64	2.07	2.19
第二葉厚度(mm)	1.96±0.42	2.11	2.18	2.28	2.08
第三葉厚度(mm)	2.20±0.26	2.22	2.05	—	2.29
第四葉厚度(mm)	2.27±0.26	—	—	—	—
第一葉葉長(cm)	3.9±1.0	5.4	2.5	3.9	3.5
第一葉葉寬(cm)	2.5±0.5	3.2	1.9	2.4	2.5
第二葉葉長(cm)	3.9±0.6	4.9	4.2	4.3	3.9
第二葉葉寬(cm)	2.6±0.5	3.2	2.7	2.8	2.7
第三葉葉長(cm)	3.3±0.6	3.4	3.7	—	2.8
第三葉葉寬(cm)	2.6±0.4	2.8	2.6	—	2.5
第四葉葉長(cm)	2.9±0.4	—	—	—	—
第四葉葉寬(cm)	2.4±0.3	—	—	—	—

Growing period: Sep. 2020 to Feb. 2022.

All values are the mean ± standard deviation ($n = 8$).

S: the putative transgenic *Phalaenopsis* plants.

討 論

一、擬轉殖培植體之篩選、誘導增殖與再生以及出瓶培養

蘭科與極少數作物所特有的擬原球體具備增殖倍率高、穩定性佳、單一擬原球體即能再生成完整植株等優良特性，目前許多以蝴蝶蘭為目標作物進行基因轉殖相關研究多應用擬原球體作為轉殖之對象(尤，2020；Chan and Chan, 2005；Semiarti *et al.*, 2007)，本試驗同樣採取蝴蝶蘭'SPH41D'之擬原球體作為目標材料。將甫完成農桿菌感染作業的培植體，直接置於含有 5 ppm glufosinate 之 T2 培養基中進行篩選，篩選濃度較前人蝴蝶蘭基因轉殖研究使用之 1 ppm 相比為高(尤，2020)，且與多數文獻報告相同，於篩選作業前未執行癒傷處理(Chan and Chan, 2005；Hsieh *et al.*, 2020；Li *et al.*, 2013；Semiarti *et al.*, 2007)，減少逃脫植物的可能性。選別時間達 8 周，於篩選初期即可以觀察到部分擬原球體開始黃化或頂芽位置出現小黑點，隨後此黃褐化狀態逐漸蔓延、伴隨生長停滯，最終整體褐化死亡；此過程多為不可逆轉，當黃褐化出現後即使立即移除篩選藥劑，多數培植體仍生育不良、終將趨向衰亡。同時發現培植體生育狀態與轉殖後存活率有相當關聯，倘擬轉殖培植體生長不良，常發生轉殖後全數死亡情況，因此，在誘導增殖之繼代階段，需特別剔除培植體呈現黃化白化與玻璃質化等狀態不佳者，以提高轉殖效能與成功率。

於 T2 培養基持續繼代培養，歷經抽芽發根後，轉殖完成之擬原球體將發育成為植株，需特別待擬轉殖植株大小妥適、生長健壯且葉片與根系數目足量，再進行出瓶定植作業，否則可能影響出瓶植株死亡率。另蝴蝶蘭根系屬肉質根，移植時應仔細輕柔、以避免受傷。

二、擬轉殖植株之目標基因分子層次表現分析

PCR 分析結果，於 12 棵擬轉殖植株中，計有 4 株順利檢測到預期之 DNA 片段大小，其中編號 S5、S10 成功偵測到目標功能性基因 *VRN1*、*PaSOC1* 與 *PaFT* 同時表達；S9 檢測到 *VRN1* 與 *PaFT* 一同表現；S2 則僅有 *PaFT* 表達；且 4 棵轉殖植株之轉錄因子基因 *AlcR* 和篩選標誌基因 *bar* 皆得以成功偵測，說明包含 pMLBART-*AlcR*-*AlcA*-*VRN1*、pMLBART-*AlcR*-*AlcA*-*PaSOC1*、pMLBART-*AlcR*-*AlcA*-*PaFT* 在內的 3 個載體已成功導入。而 pCAMBIA1301-35S-*VRN3* 中含有之 *VRN3*、*gus* 與 *hptII* 共 3 個轉基因均未順利檢測到其表達，推測可能原因為本試驗採用 glufosinate 作為篩選藥劑，故僅帶有 hygromycin 抗性之 pCAMBIA1301-35S-*VRN3* 載體轉殖植株於篩選過程並無優勢，導致篩選後成功存活機率低，進而導致此結果。囿於載體構築策略，須先執行乙醇誘導處理後再進行 RT-PCR 分析，針對目標基因之 RNA 檢測結果，S5、S9 可同時偵測到 *VRN1* 與 *PaFT*；S10 則有 *VRN1* 與 *PaSOC1* 基因 mRNA 同時表達；然而 S2 則未檢測到任何轉基因，說明該轉殖植株或許有嵌合體的可能出現。

三、轉殖植株與經轉殖未檢測到目標基因植株之性狀調查比較

在各調查項目中，僅極少數轉殖植株之調查結果高出或低於未成功轉殖植株的平均值標準差，並非常態性發生，說明完成外源基因導入之轉殖蝴蝶蘭，其生長發育並未受到基因轉殖作業的影響，也沒有出現生育異常或畸型葉等問題。換言之，本試驗之農桿菌基因轉殖作業，並無造成位置效應或其他不良影響產生。

參 考 文 獻

- 尤振豪。2020。抗病基因(*lys*、*cecB*)及調控春化作用基因(*VRN1*、*AGL19*、*FT*、*SOC1*)轉殖到蝴蝶蘭之研究。國立中興大學園藝學系碩士學位論文。
- 吳柏緯。2021。調節花期基因轉殖至蝴蝶蘭之研究。國立中興大學園藝學系碩士學位論文。
- 陳文輝。2002。蝴蝶蘭的品種改良。科學發展 351：32-39。
- 葉志新、李淑真、廖芳心、葉育哲、蔡月夏、蔡娟婷。2012。蝴蝶蘭之雜交育種。2011年花卉研究團隊成果發表會專刊：25-34。
- 蔡娟婷、賴思倫、陳珊妮、戴廷恩、謝廷芳、呂椿棠。2013。白花蝴蝶蘭葉片性狀與開花性狀之相關性探討。台灣農業研究 62：11-20。
- Chan, Y. L. and M. T. Chan. 2005. Both protein- and RNA-mediated mechanisms involved in the resistance of *Phalaenopsis* transformed with viral coat protein against *Cymbidium Mosaic Virus*. *J. Genet. Mol. Biol.* 16: 26-39.
- Hsieh, K. T., S. H. Liu, I. W. Wang, and L. J. Chen. 2020. *Phalaenopsis* orchid miniaturization by overexpression of *OsGA2ox6*, a rice GA2-oxidase gene. *Bot. Stud.* 61: 10.
- Li, J., P. Kuang, R. D. Liu, D. Wang, Z. N. Wang, and M. R. Huang. 2013. Transfer of GFP and NPI, two disease-resistant genes, into a *Phalaenopsis* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Pak. J. Bot.* 45: 1761-1766.
- Mercuriani, I. S., A. Purwantoro, S. Moeljopawiro, and E. Semiarti. 2012. Insertion of a flowering gene, *PaFT*, into *Phalaenopsis amabilis* orchid using *Agrobacterium tumefaciens*. *Proceeding of the 5 Indonesia Biotechnology Conference* 152-161.
- Semiarti, E., A. Indrianto, A. Purwantoro, N. Suseno, S. Isminingsih, Y. Yoshioka, H. Iwakawa, Y. Machida, and C. Machida. 2007. *Agrobacterium*-mediated transformation of the wild orchid species *Phalaenopsis amabilis*. *Plant Biotechnol.* 24: 265-272.
- Semiarti, E., I. S. Mercuriani, R. Rizal, A. Slamet, B. S. Utami, I. A. Bestari, A. Purwantoro, S. Moeljopawiro, Y. Machida and C. Machida. 2015. Overexpression of *PaFT* gene in the wild orchid *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume. *The 5th International Conference on Mathematics and Natural Sciences* 090005: 1-4.

Studies on Transformation of Flowering Regulation Related Genes into 'SPH41D' *Phalaenopsis*

Yu-Sheng Lin¹⁾ I-Chun Pan²⁾ Yi-Jun Dong³⁾

Po-Heng Chen¹⁾ Menq-Jiau Tseng⁴⁾

Key words: *Phalaenopsis*, *Agrobacterium*-mediated plant transformation, Flowering regulation related genes

Summary

Phalaenopsis orchids have become one of popular and important economical flowers around the world and even in Taiwan. However, the long juvenile stage and the rapid-changing commercial variety favorite at *Phalaenopsis* market are critical issues for time-consuming of *Phalaenopsis* breeding. In this study, *Agrobacterium*-mediated gene co-transformation was used to introduce flowering regulation genes (*VRN1*, *PaSOC1*, *PaFT*, *VRN3*) into *Phalaenopsis*. The target genes were mostly driven by alcR/alcA promoter, which is ethanol-inducible. The objective of this study was to obtain the transgenic *Phalaenopsis* orchids that could be regulated flowering time. The results of PCR and RT-PCR analysis showed that the target genes, *VRN1*, *PaSOC1* and *PaFT*, had been successfully transferred into the genome of putative transgenic *Phalaenopsis* plants and expressed its mRNA. In addition, there were no significant difference in plant characteristics between transgenic and non-transgenic *Phalaenopsis* plants.

-
- 1) Student in Ph.D. program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.
 - 2) Associate Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.
 - 3) Administrative assistant, World Vegetable Center.
 - 4) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.

