

轉殖 *API* 基因至春石斛蘭之研究

董怡君¹⁾ 潘怡君²⁾ 林育聖³⁾ 曾夢蛟⁴⁾

關鍵字：春石斛蘭、基因轉殖、調控開花基因、*API*

摘要：*API* (*APELLATA1*) 基因屬於 MADS-BOX 轉錄因子，功能可歸納為兩類：一為調控花器官形態發育，決定花器分生組織的分化和花器形成。另一功能為調控花序分生組織向花分生組織的轉變，使植株提早開花。本研究利用農桿菌轉殖法，將選殖至水稻之 *OsMADS14* (*API*) 基因轉殖到石斛'白花一號' (*Dendrobium* 'White No.1') 之擬原球體 (Protocorm-Like Body, PLB)，經篩選、再生、增殖、健化、出瓶。擬轉殖植株葉片之 PCR、RT-PCR 分析的結果顯示，轉殖之 *API* 基因已存在於轉殖葉片之基因組，並表現其 mRNA，且觀察到有轉殖株於瓶內出現花苞。

前 言

春石斛蘭 (Nobile type *Dendrobium*) 為蘭科石斛蘭屬節生石斛節 (*Dendrobium* section *Dendrobium*)、以金釵石斛 (*Den. nobile*) 為基本種所雜交選育以及改良出之品種群的總稱。其擁有花色繁多豔麗、大且多之花朵、花期長及香氣濃郁等特色，主要作為贈禮盆花，為全球花卉市場的新興盆花。台灣具有多個石斛蘭原種，也是春石斛蘭的重要親本金釵石斛的分佈範圍之一，加上台灣處亞熱帶氣候，氣候上適合進行春石斛蘭的栽培與生產，因此春石斛蘭也為台灣具經濟栽培及種苗外銷潛力的新興蘭科作物。然台灣在新穎及恰當的外銷品種、長的幼年期以及低溫催花等技術上尚待開發及改進。

植物開花相關基因的研究以阿拉伯芥中的研究最為詳盡，依照調節開花相關的基因在整體調控系統中扮演的腳色，可將基因群區分成上、中、下游三部分，分別為受到環境因子 (溫度、日照、光質等) 調控的上游感應 (sensor) 基因 (如 *VIN3*、*VRN3*)，接受上游基因訊息並將其傳遞並彙集到中游的開花整合 (integrator) 基因 (如 *FT*、*SOC1*)，使之能夠促使

-
- 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助理教授。
 - 3) 國立中興大學園藝學系博士班研究生。
 - 4) 國立中興大學園藝系教授，通訊作者。

下游具有直接影響開花能力的基因 (如 *API*、*LFY*) 適時及大量表現，使植物莖頂分生組織轉變為花器分生組織，進而使植物開花 (Kim *et al.*, 2009)。

在阿拉伯芥中，*FLC* 基因為一個重要的開花抑制基因，在一般的狀況下抑制開花整合基因的表現 (Helliwell *et al.*, 2006; Searle *et al.*, 2006)。然而在單子葉禾本科的穀類作物 (Shitsukawa *et al.*, 2007)、蝴蝶蘭 (Hsiao *et al.*, 2011)、金釵石斛 (Liang *et al.*, 2012) 等卻無法發現阿拉伯芥 *FLC* 同源基因，僅有小麥發現有類似功能的負向調控基因 *VRN2*。

API (*APELLATA1*) 基因屬於 MADS-BOX 轉錄因子，功能可歸納為兩類：一為調控花器形態發育，另一功能為調控花序分生組織向花分生組織的轉變：Liljgren 等 (1999) 報導，阿拉伯芥 35S::*API* 轉植株不管是在長日照或短日照皆較野生型早開花。Peña 等 (2001) 大量表現阿拉伯芥 *API* 於雜交枳橙 (*Citrus sinensis* L. Osbeck × *Poncirus trifoliata* L. Raf)，期望獲得縮短幼年性提早開花之柑橘類果樹，研究使用無菌播種五週之種子為轉殖材料，使用農桿菌導入 35S::*API*，結果顯示 35S::*API* 轉植株不但幼年期縮短，且於首年就開花結果。邱 (2007) 自文心蘭 *Onc. Gower Ramsey* 選殖出之 *OMADS10*，其相似於阿拉伯芥中 A 群 MADS Box 基因的 *API*，在所有的發育時期與器官皆可偵測到其 *OMADS10* mRNA，且於阿拉伯芥 35S::*OMADS10* 轉植株中觀察到植株會有提早開花並且有終結花 (terminal flowers) 產生的現象。本研究的目標基因 *API* 為自水稻選殖之 *OsMADS14*，*OsMADS14* 主要表現於水稻的生殖器官中，親緣關係分析水稻 *OsMADS14* 與阿拉伯芥 *API* 具有高度相關性，同屬於 A 類基因，將其歸類為 *API-like* 基因 (范，2014)。Jeon 等 (2000) 報導，過量表現 *OsMADS14* 可以使水稻提早開花，甚至在水稻的癒傷組織階段就可以觀察到類似花之構造。

因此本研究嘗試將以 *API* 基因所構築的農桿菌轉殖載體，以農桿菌轉殖法轉殖到春石斛蘭，期望以基因轉殖技術創新出調控植株花期的技術，開發出可調控花期之高品質轉殖春石斛蘭，促進台灣花卉產業技術升級。

材料與方法

一、試驗材料

(一)、基因轉殖植物材料

轉殖試驗使用春石斛之 PLB 和 Callus 為基因轉殖之標的材料，使用品種為 '白花一號' (*Den. 'White No.1'*)。取自花授粉 5~6 個月後之成熟未開裂果莢，以 0.2% 商業用漂白水 Clorox 進行表面消毒，無菌播種於播種培養基中 (1/4 MS (Murashige and Skoog, 1962)、Sucrose 2%、Tryptone 0.1%、agar 7.5%、pH 5.5)。1~2 個月發芽後，切除芽苗之芽後置於 PLB 誘導培養基 (1/2MS (Murashige and Skoog, 1962)、Sucrose 2%、Tryptone 0.1%、BA 0.2 ppm、agar 7.5%、pH 5.5)，一個月後基部會肥大增生 PLB 或 Callus，之後每隔 2 個月

切芽持續繼代於 PLB 誘導培養基作為轉殖材料。

(二)、農桿菌轉殖菌系與載體

本研究使用之農桿菌菌系為 *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101)。轉殖載體 p1301-Ubi-API (啟動子為 *Ubiquitin*、目標基因為水稻 *API (MADS14)*、報導基因為 *gusA*、篩選標誌基因為 *hptII*，由中興大學分子生物研究所陳良築教授提供)。

二、試驗方法

(一)、農桿菌基因轉殖方法

將農桿菌由 Stock 以接菌鐵環塗於含有 100 ppm kanamycin 之 LB plate，在 28°C 培養 24-36 小時，將菌盤保存於 4°C 備用。接種前兩日從菌盤挑選單一菌落，接種於含有適當抗生素之 5 ml LB 培養液中，於 28°C 搖晃培養 2 天。接種前取 2 ml 菌液以 50 ml 離心管離心，去除上清液後以 30 ml 感染液 (1/4 MS, Sucrose 2%, Tryptone 0.1%, 金剛砂 0.1%, AS (acetosyringone) 200 μ M, pH5.5) 重新懸浮，接著將植物材料放入感染液搖晃 (150-160 rpm) 培養 30 分鐘，去除感染液後將植物材料置於無菌擦手紙上吸去多餘感染液。將植物材料放於含有 200 μ M AS 之 PLB 誘導培養基，於 28°C 黑暗環境共培養兩天。再以 Wash 液 (1/4 MS, Sucrose 2%, Tryptone 0.1%, Cefotaxime 200 ppm, pH5.5) 搖晃 10 分鐘 (150-160 rpm) 清洗三次，移入含有 Cefotaxime 150 ppm 之 PLB 誘導培養基，一個月後以 10 ppm hygromycin 進行篩選。

篩選後之培植體置於不含荷爾蒙之再生培養基。培植體再生分化成芽苗及小植株後再移至發根培養基 (1/4 MS (Murashige and Skoog, 1962)、Sucrose 2%、Activated carbon 1%、Myo-inositol 0.2%、Tryptone 0.1%、agar 7.5%、pH 5.5) 誘導發根，待根系發展後進行出瓶，以滅過菌之水苔為介質，定植於 2 吋盆中。

(二)、擬轉殖植株檢測

1. 植物 DNA 萃取

本試驗使用 BioKit Plant Genomic DNA Purification Kit (GeneMark, Taiwan) 進行植物 DNA 萃取。將 65°C 水浴鍋預熱，取 0.1 g 之擬轉殖植株葉片，以液態氮磨至細碎，加入 400 μ l Extraction buffer 和 5 μ l RNase 後收集到 1.5 ml eppendorf 中，Vortex 5-10 秒混勻，於 65°C 水浴 20 分鐘，每十分鐘上下搖晃 eppendorf 數次以混合均勻。加入 100 μ l Precipitation Buffer，搖勻混和後置於冰上冷卻 5 分鐘，Vortex 搖晃混勻後，以 12,000 \times g 離心 3 分鐘，小心吸取上清液至新的 1.5 ml eppendorf 中，加入 1.5 倍體積之 Binding Buffer，pipetting 混勻。吸取 750 μ l 混合液到已裝設 Collection Tube 之 Spin Column 中，12,000 \times g 離心 1 分鐘，去除 Collection Tube 之廢液，加入剩餘混合液到 Spin Column 中，再以 12,000 \times g 離心 1 分鐘，去除廢液。加入 600 μ l Wash Buffer 以 12,000 \times g 離心 1 分鐘後去除廢液，再重複 Wash 一次。去除廢液後，以 12,000 \times g 離心 5 分鐘，將殘液完全去除。將 Spin Column 置於新的 1.5 ml eppendorf 中，加入 50 μ l 之 Elution Buffer，靜置 2 分鐘後，以 12,000 \times g 離心 1 分鐘，獲得所需之 DNA，貯存於 -20°C 備用。

2. 植物 Total RNA 萃取

本試驗使用 GenePure RareRNA reagent (GenePure, Kaysville, UT, USA) 進行植物 RNA 萃取。取 0.1 g 之擬轉殖株葉片，以液態氮磨至細碎，加入 1 ml RareRNA reagent 後收集到 1.5 ml eppendorf 中，靜置於室溫 5 分鐘。加入 300 ul Chloroform 小心反轉搖勻，置於冰上 5 分鐘，之後以 12,000 rpm 離心 5 分鐘，吸取上清液體到新的 eppendorf 中。加入兩倍體積的 95% 酒精後溫柔混勻，再以 12,000 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液保留沈澱，再加入 1 ml 70% 酒精 wash，spin down 數次盡可能去除酒精。最後以 50 ul 之 DEPC 水回溶 RNA 貯存於 -70°C 備用。

3. 聚合酵素連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

採用 Thermo Hybaid Px2 Thermal cycler (Thermo Scientific, USA) 為反應儀器。PCR 反應總體積為 25 ul，含有 10x PCR buffer for Blend taq (2.5 ul)、2 mM dNTPs (2 ul)、10 uM primer (1 ul)、Blend taq -Plus- (0.25 ul) (Toyobo, Osaka, Japan) 及 100 ng 植物 DNA (1 ul)，補水至 25 ul，在循環式溫度控制器中，進行 PCR 增幅反應。

4. 偵測 *MADS14*、*gus* 及 *hptII* 等目標基因

偵測 *MADS14* 基因引子，分別為 5'-ATGGGGCGGGGCAAGGTGCA-3' (AADA-1) 及 5'-GCCGACTACCTTGGTGATCTCGCC-3' (AADA-2)，可增幅出 0.8 kb 片段。反應流程為 94°C 2 分鐘，1 個 cycle; 94°C 30 秒，60°C 30 秒，72°C 60 秒，共進行 35 個 cycles，最後再進行 72°C 10 分鐘 1 個 cycle。

偵測 *gus* 基因引子，分別為 5'-CGTCCTGTAGAAACCCCAACCC-3' (GUS-F) 及 5'-TTTGCCTCCCTGCTGCGG-3' (GUS-R)，可增幅出 1.8 kb 片段。反應流程為 94°C 2 分鐘，1 個 cycle; 94°C 30 秒，60°C 30 秒，72°C 120 秒，共進行 35 個 cycles，最後再進行 72°C 10 分鐘 1 個 cycle。

偵測 *hptII* 基因引子，分別為 5'-CTATTTCTTTGCCCTCGGACG-3' (hptII F) 及 5'-CCGCGACGTCTGTGCGAGA-3' (hptII R)，可增幅出 1007 bb 片段。反應流程為 94°C 2 分鐘，1 個 cycle; 94°C 30 秒，54°C 30 秒，72°C 60 秒，共進行 35 個 cycles，最後再進行 72°C 10 分鐘 1 個 cycle。

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

本試驗使用 BIONOVAS HiScript I™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Bionovas, Canada) 進行第一鏈 cDNA 合成 (Reverse transcription)，再進行 PCR 增幅。反轉錄 (First strand Synthesis) 步驟如下：取 1 ug-10 pg 之 RNA，加入 1 ul 2x Fast premix 和 2 ul Oligo dT，再以 RNase free ddH₂O 補至 19 ul，於 65°C 作用 5 分鐘，再移到冰上 1 分鐘冷卻。再加入 1 ul HiScript I Reverse Transcriptase，於 42°C 作用 30 分鐘，再移至 85°C 作用 5 分鐘，完成 cDNA 之合成。

進行 RT-PCR 時以 cDNA 作為模板進行 PCR 工作。偵測各基因之引子及 PCR 反應流程，與上述 (轉殖植株葉片之 PCR 分析) 相同。

6. DNA 電泳

PCR 反應完成之產物，分別取 8 ul 加入 6 倍電泳追蹤染劑 (6x loading buffer)，以 1.5% 的 Invitrogen Ultrapure agarose，放置於 1X TAE buffer (40 mM Tris acetate, pH8.0、1 mM EDTA) 中，進行 DNA 電泳分離。完成後放入 0.5 mg/ml 之溴化乙錠 (ethidium bromide, EtBr) 溶液中，染色 5 分鐘後，退染 5-10 分鐘，再置於 UV 光箱 (Gel logic 200 Imaging system) 檢視膠體上之 DNA 片段，照相並儲存。

結 果

(一)、p1301-Ubi-API 載體之檢測

為確認轉殖載體是否正確，利用限制酵素切割來確認 DNA 片段大小是否符合預期基因片段大小。試驗結果顯示轉殖載體 p1301-Ubi-API (圖 1 A)，以 *KpnI* 和 *SacI* 限制酵素切割，所得片段大小正確無誤。p1301-Ubi-API 經 *KpnI* 和 *SacI* 切割產生約 0.75 kb 之水稻 *API (MADS14)* 基因片段 (圖 1 B)。

(二)、擬轉殖植株之篩選、再生及增殖

p1301-Ubi-API 之春石斛培植體是張威鈞學弟於 103 學年度 (103/09-104/06) 進行園藝作物研究法課程之專題研究所獲得之材料。本研究也進行將攜帶 p1301-Ubi-API 載體進行農桿菌感染春石斛 PLB 後、所獲得的擬轉殖培植體與上述材料合併進行篩選、再生及植株增殖。

經 10 ppm hygromycine 篩選後之春石斛'白花一號'擬轉殖培植體，成活芽苗移到發根培養基誘導抽梢及發根 (圖 2 A-D)，發根之擬轉殖植株進一步進行增殖和健化 (圖 2 E-O)。試驗中發現在瓶中增殖與健化過程中，偶會出現擬轉殖植株結花苞的情形 (圖 2 P-Q)，而未轉殖對照組則無，然而大部份花苞會發生消苞及落花苞的現象。擬轉殖植株及未轉殖植株之春石斛蘭出瓶移至 2 吋盆生長之情形如圖 2 R-Y 所示，觀察春石斛蘭苗株外表型顯示，擬轉殖植株及未轉殖植株之葉型、葉色、植株形態及生長狀態等園藝外表型性狀均無差異。

(三)、擬轉殖植株之基因及表現分析

以轉殖 p1301-Ubi-API 載體之擬轉殖植株葉片萃取 DNA 及 RNA，進行 PCR 和 RT-PCR 檢測以分析目標基因 *API*、報導基因 *GUS* 和篩選基因 *hptII*，使用之引子參照表 1。PCR 檢測結果如圖 3 所示，12 個供試樣品中，AP1-1、2、3、5、6、7、8、9、10、12 等十株擬轉殖植株皆能偵測到 *API* (747 bp)、*GUS* (1800 bp) 和 *hptII* (1007 bp) 等三個轉殖的基因片段，然而 AP1-11 擬轉殖植株僅偵測到 *API* 基因片段。RT-PCR 分析之結果如圖 4 所示，分析到 *API*、*GUS* 和 *hptII* 等三個轉殖基因之 mRNA 計有 AP1-1、2、3、5、6、8、9 等七株擬轉殖植株的葉片，AP1-7 擬轉殖植株僅能偵測到 *API* 及 *GUS* mRNA。

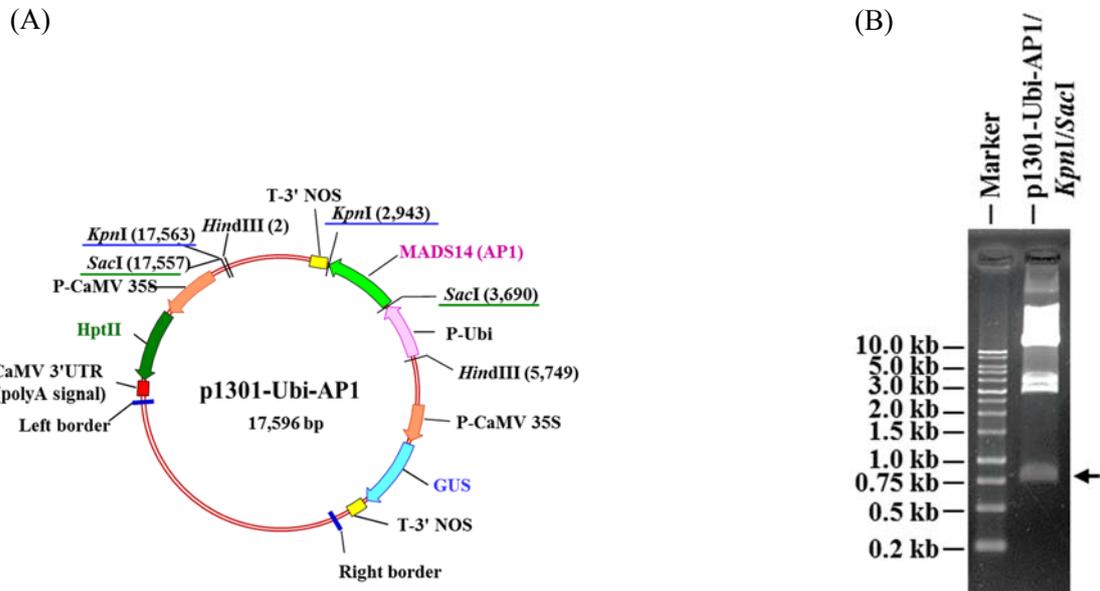


圖 1. p1301-Ubi-API 之基因圖譜 (A)及以限制酵素切割 (B)之情形。(A) p1301-Ubi-API : 帶有 *API* (*MADS14*)基因之轉殖載體。(B) p1301-Ubi-API 經 *KpnI* 和 *SacI* 限制酵素切割產生約 0.75 kb 之 *API* (*MADS14*) 基因。

Fig. 1. The genetic maps of p1301-Ubi-API (A) and digestion by restriction enzymes (B). (A) p1301-Ubi-API: plasmid containing the *API* (*MADS14*) gene; (B) p1301-Ubi-API was digested by *KpnI* and *SacI* to produce 0.75 kb DNA fragment of *API* (*MADS14*) gene.

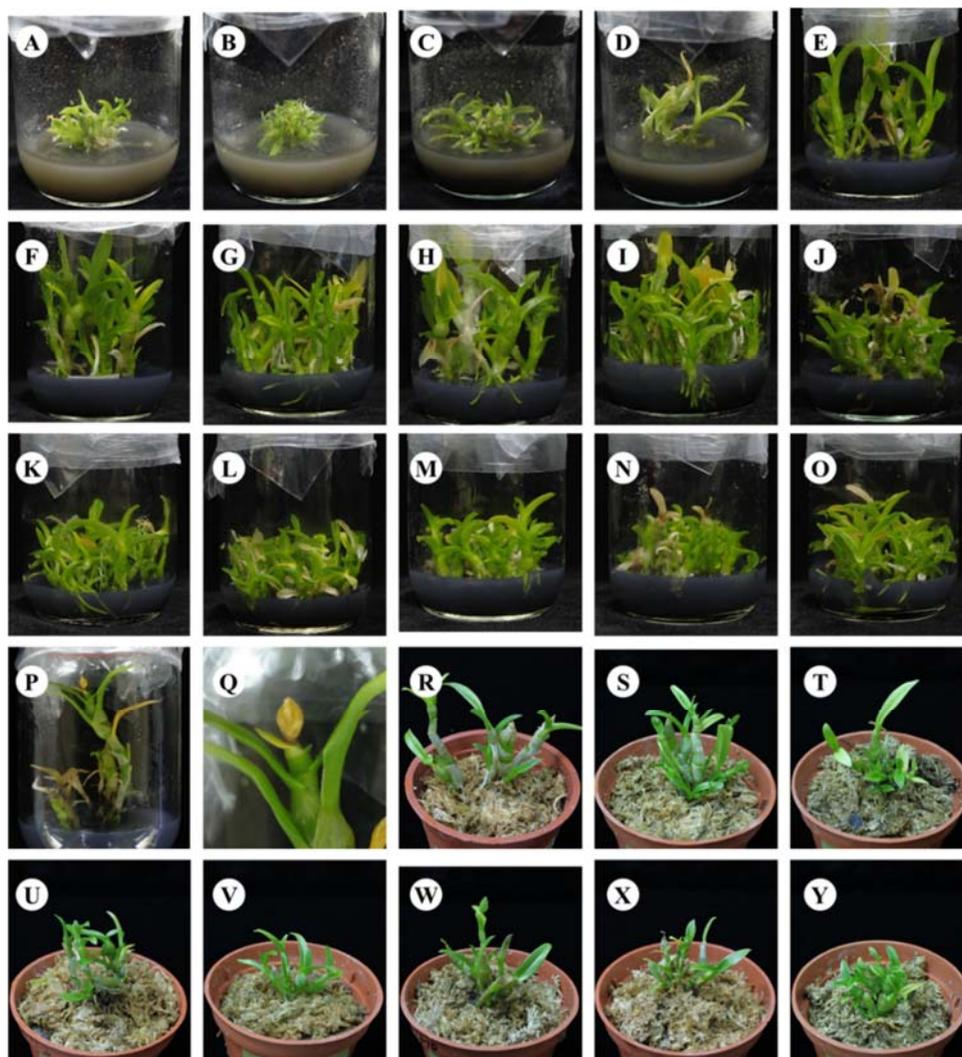


圖 2. 農桿菌法轉殖 p1301-Ubi-AP1 之春石斛'白花一號' (*Den.* 'White No.1') 擬轉殖植株的再生及增殖之情形。(A-D) Hygromycin 篩選成活擬轉殖培植體誘導抽芽梢及長根；(E-O) 增殖與健化；(P) 再生擬轉殖植株在瓶中結花苞；(Q) 花苞放大圖；(R-X) 出瓶後在 2 吋盆生長之情形；(Y) 未轉殖植株，白花一號 (*Den.* White No.1)。

Fig. 2. Regeneration and proliferation of putative transformed plants of *Den.* 'White No. 1' via *Agrobacterium* mediated transformation of p1301-Ubi-AP1. (A-D) After hygromycin selection, survival explants were induced for multiple shoots and roots formation; (E-O) Proliferation and hardiness; (P) Formation of *in vitro* flowering bud in putative transformed plant; (Q) Magnified image of flowering bud; (R-X) *In vitro* putative transformed seedlings were transplanted into 2-inch pots; (O) Untransformed plant.

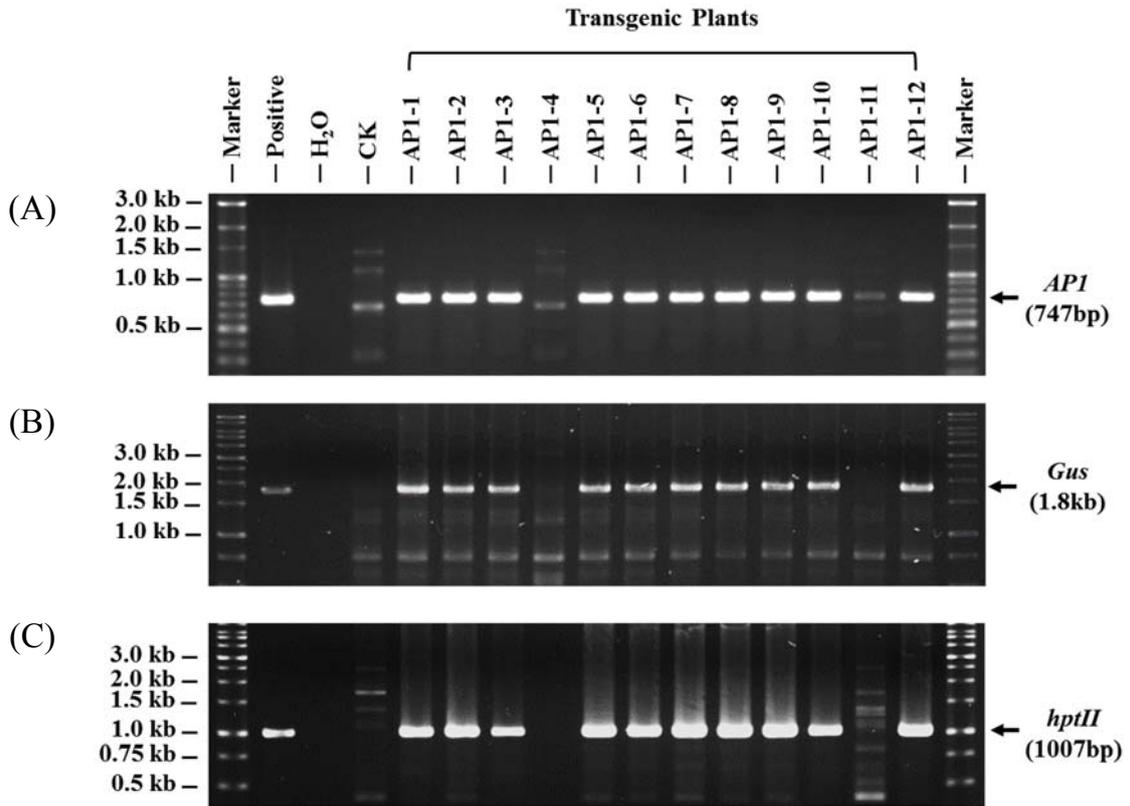


圖 3. 轉殖 p1301-Ubi-AP1 之春石斛'白花一號' (*Den.* 'White No.1') 擬轉植株葉片，經 PCR 分析 *API* (A)、*Gus* (B)和 *hptII* (C)基因之情形。CK：未轉植株葉片。Positive：p1301-Ubi-AP1 (*API*、*Gus*、*hptII*)。

Fig. 3. PCR analysis of *API* (A), *Gus* (B), and *hptII* (C) gene fragment in putative transformed plants of *Den.* 'White No.1' via *Agrobacterium* mediated transformation of p1301-Ubi-AP1. CK: untransformed plants. Positive: p1301-Ubi-AP1 (*API*, *Gus*, and *hptII*).

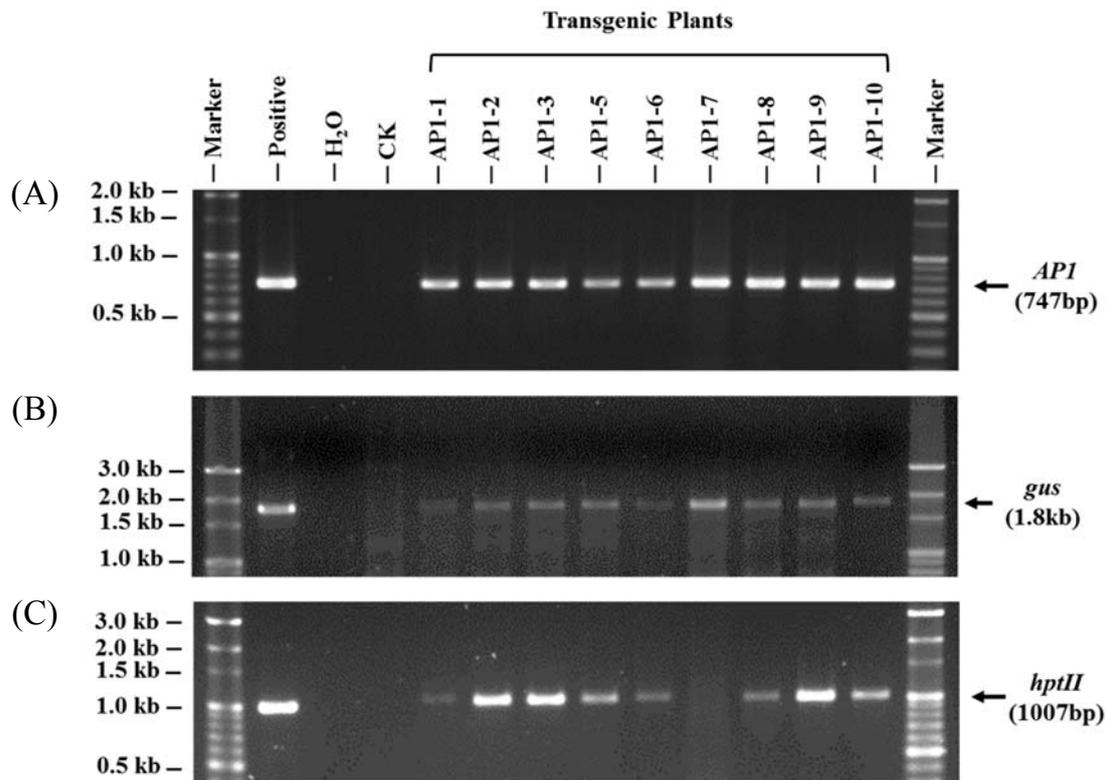


圖 4、轉殖 p1301-Ubi-API 之春石斛 '白花一號' (*Den. 'White No.1'*) 擬轉植株葉片，經 RT-PCR 分析 *API* (A)、*Gus* (B) 和 *hptII* (C) mRNA 之情形。CK：未轉殖株葉片。Positive：p1301-Ubi-API (*API*、*Gus*、*hptII*)。

Fig. 4. RT-PCR analysis of *API* (A), *Gus* (B), and *hptII* (C) mRNA in putative transformed plants of *Den. 'White No.1'* via *Agrobacterium* mediated transformation of p1301-Ubi-API. CK: untransformed plants. Positive: p1301-Ubi-API (*API*, *Gus*, and *hptII*).

討 論

(一)、擬轉殖植株之篩選、再生及增殖

p1301-Ubi-API 是以春石斛 '白花一號' (*Den. 'White No.1'*) 之 PLB 作為轉殖材料。將經 10 ppm hygromycine 篩選後存活之擬轉殖培植體誘導抽芽梢及長根 (圖 2 A-D)，發根後之擬轉殖植株繼續進行根系誘導生長以及值株增殖與健化，可看到本載體轉殖之擬轉殖株生長旺盛且植株健壯 (圖 2 E-O)。挑選根系生長良好之健壯植株進行出瓶並種植在溫室 (圖 2 R-X)。在繼代過程中觀察到偶有擬轉殖株在醬瓜瓶中出现花苞，然而沒有發展完全且很

快就黃化、落蕾 (圖 2 P-Q)。在前人研究中誘導大量表現 *API* 出現提早開花之現象，已有報導 (Sarah *et al.*, 1999; Peña *et al.*, 2001; 邱, 2007)。一般觀賞石斛蘭作為瓶中開花 (*in vitro* flowering) 的材料大多為小型秋石斛品系，例如秋石斛蘭雜交種 *Den.* 'Madame Thong-In' (Sim *et al.*, 2007) 和 *Den.* 'Chao Praya Smile' (Hee *et al.*, 2007) 等，大型春石斛蘭'白花一號' (*Den.* 'White No.1') 及紅皇帝'王子' (*Den.* Red Emperor 'Prince') 的瓶中開花則未見報導，推測大型石斛蘭的花苞不易在培養瓶中生長發育可能為其限制瓶中開花的重要因子。本試驗使用之 *API* 為自水稻選殖之 *MADS14*，Jeon 等 (2000) 將 *MADS14* 過量表現於水稻中也觀察到提早開花之現象。由於本試驗之擬轉殖植株尚在幼苗階段，有待繼續觀察擬轉殖植株生長發育長大後是否有提早開花的現象。

(二)、擬轉殖植株之基因及表現分析

以 PCR 分析 p1301-Ubi-*API* 擬轉殖植株之葉片 DNA，12 株擬轉殖植株中僅 *API*-4 擬轉殖植株無法偵測到所有轉殖的三種基因，*API*-11 擬轉殖植株只偵測到 *API* 基因片段，其餘 10 株擬轉殖植株皆能偵測到 *API*、*GUS* 和 *hptII* 等三種轉殖的基因 (圖 3)。進一步挑選能偵測到三種轉殖的基因片段之其中九株擬轉殖植株 *API*-1、2、3、5、6、7、8、9、10，抽取葉片之 RNA 進行 RT-PCR 偵測基因表現，結果顯示九株擬轉殖植株皆能偵測到 *API* 目標基因表現，其中 *API*-7 只能偵測到 *API* 和 *GUS* 表現，無法偵測到 *hptII* 基因表現 (圖 4)。分析之結果顯示轉殖之 *API* 目標基因已成功的轉移到春石斛蘭'白花一號' (*Den.* 'White No.1') 的染色體並且表現 *API* mRNA。

本研究已完成：1. 共同轉殖 p1304-35S-*VRN1* 及 p1304-35S-*AGL19*；2. 轉殖 p1301-35S-*VIN3*；3. 共同轉殖 pMLBART AlcA-AlcR-PaFT 及 pMLBART AlcA-AlcR-PaSOC1；4. 轉殖 p1301-Ubi-*API*；5. 共同轉殖 p1304-35S-*FT* 和 p1301-Ubi-*GA2ox6* 等五種組合之農桿菌感染春石斛之 PLB、篩選、再生、增殖及擬轉殖植株的基因分析。擬轉殖植株葉片之 PCR、RT-PCR 分析之結果顯示，轉殖之 *DnAGL19*、*VRN1*、*VIN3*、*SOC1*、*FT*、*API* 及 *GA2ox6* 等基因已存在於轉殖葉片之基因組，並表現其 mRNA。調察春石斛蘭植株外表型顯示，擬轉殖植株及未轉殖植株之葉型、葉色、植株形態及生長狀態等園藝外表型性狀均無差異。雖然在組培瓶中增殖與健化過程中會出現轉殖春石斛蘭植株結花苞的現象，而未轉殖對照組則無，然而大部份花苞會發生消苞及落花苞的現象。但目前已出瓶的轉殖春石斛蘭，受限於幼年期的因素，並未有開花的現象。

蘭花產業為台灣農業發展的重要命脈，然而其太長幼年期為困擾台灣蘭花業者的重大問題之一，亦是面對國際蘭花產業競爭所須突破的瓶頸。幼年性、春化作用、光週期現象是三個決定蘭花開花與否的最主要的因素，三個因子與蘭花種類、個體發育及季節有關 (聶, 2005)。幼年性是營養生長轉變成為生殖生長的重要階段，屬於植物的初期生長階段，在此時期大多數無法採用任何處理誘導開花。在蘭科植物中幼年期可能很長 (1 年至 10 多年)，商業雜交品種約為 1.5-3 年。本研究有待繼續維護與繁殖現有基因轉殖春石斛蘭植株及後裔，並分析其遺傳穩定性及園藝及開花特性。

參考文獻

- 邱怡芬。2007。文心蘭中調控開花時間相關基因之選殖與特性分析。中興大學生物科技學研究所碩士學位論文。105pp。
- 范秀姿。2014。迷你及早開花蝴蝶蘭轉殖系統之建立-*GA2ox6* 及早開花基因 *OSMADS14* 之應用。中興大學分子生物學研究所碩士學位論文。59pp。
- Helliwell, C. A., C. C. Wood, M. Robertson, W. James Peacock, and E. S. Dennis. 2006. The *Arabidopsis* FLC protein interacts directly in vivo with *SOC1* and *FT* chromatin and is part of a high-molecular-weight protein complex. *Plant J.* 46: 183-192.
- Hsiao, Y. Y., Z. J. Pan, C. C. Hsu, Y. P. Yang, Y. C. Hsu, Y. C. Chuang, Y. C. Chuang, H. H. Shih, W. H. Chen, W. C. Tsai, and H. H. Chen. 2011. Research on orchid biology and biotechnology. *Plant Cell Physiol.* 52: 1467-1486.
- Jeon, J. S., S. Lee, K. H. Jung, W. S. Yang, G. H. Yi, B. G. Oh, and G. An. 2000. Production of transgenic rice plants showing reduced heading date and plant height by ectopic expression of rice MADS-box genes. *Mol. Breed.* 6: 581-592.
- Liang, S., Q. S. Ye, R. H. Li, J. Y. Leng, M. R. Li, X. J. Wagn, and H. Q. Li. 2012. Transcriptional regulations on the low-temperature-induced floral transition in an Orchidaceae species, *Dendrobium nobile*: an expressed sequence tags analysis. *Compar. Funct. Genom.* 2012: 757801.
- Kim, D. H., M. R. Doyle, S. Sung, and R. M. Amasino. 2009. Vernalization: winter and the timing of flowering in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 25: 277-299.
- Liljegren, S. J., C. Gustafson-Brown, A. Pinyopich, G. S. Ditta, and M. F. Yanofsky. 1999. Interactions among *APETALA1*, *LEAFY*, and *TERMINAL FLOWE-R1* specify meristem fate. *Plant Cell* 11: 1007-1018.
- Peña, L., M. Martín-Trillo, J. Juárez, J. A. Pina, L. Navarro, and J. M. Martínez-Zapater. 2001. Constitutive expression of *Arabidopsis* *LEAFY* or *APETALA1* genes in citrus reduces their generation time. *Nat. Biotechnol.* 19(3): 263-267.
- Searle, I., Y. He, F. Turck, C. Vincent, F. Fornara, S. Krober, R. A. Amasino, and G. Coupland. 2006. The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 20: 898-912.
- Shitsukawa, N., C. Ikari, S. Shimada, S. Kitagawa, K. Sakamoto, H. Saito, H. Ryuto, N. Fukunishi, T. Abe, S. Takumi, S. Nasuda and K. Murai. 2007. The einkorn wheat (*Triticum monococcum*) mutant, maintained vegetative phase, is caused by a deletion in the *VRN1* gene. *Genes Genet. Syst.* 82(2): 167-170.

Studies on Transformation of *API* Genes into Nobile Type *Dendrobium* Orchid

Yi-Chun Tung¹⁾ Yi-Chun Pan²⁾ Yu-Sheng Lin³⁾ Menq-Jiau Tseng⁴⁾

Key Word: Nobile type *Dendrobium*, Gene transformation, Flowering-Regulating Genes,
API.

Summary

API (*APELLATA1*) gene belongs to the MADS-BOX transcription factor, and its function can be summarized into two categories: one is to regulate the floral morphological development, and to determine the differentiation and floral formation of the floral meristem. Another function is to regulate the transformation of inflorescence meristems to floral meristems, and flowering early. In this study, we proposed to engineering the *OsMADS14* (*API*) genes that cloned from rice into the nobile type *Dendrobium* 'White No.1'. Constructed genes had been transformed into the PLB by *Agrobacterium*-mediated transformation. Regenerated plantlets were selected by antibiotics, induction of multiple shoots and roots formation, proliferation, hardiness, and finally transplanted into 2-inch pot and grown in greenhouse. The results of PCR and RT-PCR analysis of putative transformed plants indicated that the transformed genes were presented in the genome of transformed plants, and expressed its mRNA.

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