

Fibrillin 基因轉殖到扇形文心蘭 (*Erycina pusilla*)之研究

林 吾 睿¹⁾ 陳 俊 麟²⁾ 張 正³⁾ 曾 夢 蛟⁴⁾

關鍵字: 扇形文心蘭、原纖維蛋白基因、農桿菌基因轉殖

摘要: 本研究之目的為建立扇形文心蘭之農桿菌基因轉殖系統，並探討 *fibrillin* 基因轉殖到扇形文心蘭的可行性。使用農桿菌基因轉殖法，進行 p1304-Fib、1304-Fib-IN 及 p1304-AP1-Fib-IN 等三種載體的扇形文心蘭基因轉殖。將感染過的扇形文心蘭培植體，以螢光顯微鏡檢測其組織 GFP 螢光，在 GFP 濾鏡下可看見轉殖培植體發散綠色螢光，而未轉殖對照組(CK)則未見綠色螢光表現。轉殖培植體經過 5 mg/l hygromycin 篩選後，進行 GUS 活性染色分析，可成功偵測到 GUS 藍色反應，而未轉殖對照組則沒有反應。萃取篩選後之扇形文心蘭培植體的總 DNA，經 PCR 方式檢測均可增幅出預期的 1.0-kb 的 *fibrillin* 片段與 1.6-kb 的 *GUS* 片段，而對照組(CK)則無。萃取轉殖扇形文心蘭培植體的總 RNA，進行 RT-PCR 分析，偵在轉殖 p1304-Fib 之培植體有 *fibrillin* mRNA 1.0-kb 片段表現，其它轉殖載體 (p1304-Fib-IN、p1304-AP1-Fib-IN)及對照組(CK)均未檢測到 mRNA 之表現。此外，所有轉殖培植體均可檢測到 *GUS* 基因的 mRNA 表現，而對照組(CK)則無。在偵測內源性 *fibrillin* 基因方面，結果顯示所有轉殖培植體及對照組(CK)均可檢測到內源性 *fibrillin* 基因的 mRNA 表現。以上結果顯示，目標基因成功轉入扇形文心蘭培植體中，並依照其目的正常表現及抑制 *fibrillin* 之 mRNA 表現。

前 言

扇葉文心蘭 (*Erycina pusilla* (L.) N. H. Williams & M. W. Chase) (*Psychmorichis pusilla*、*Oncidium pusillum*) 為多年生草本，著生性小型蘭花，原產在中美洲至南美洲北部海低海

-
- 1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生。
 - 2) 中州科技大學景觀系助理教授。
 - 3) 國立中興大學園藝系副教授。
 - 4) 國立中興大學園藝系教授，通訊作者。

拔山區；屬於蘭科(Orchidaceae)、樹蘭亞科(Epidendroideae)、蕙蘭族(Cymbidieae)、文心蘭亞族(Oncidiinae)、扇葉蘭屬(*Erycina*) (Williams *et al.*, 2001)。原屬名 *Psycmorchis* 是由「扇子」與「蘭」所組成，種名是「細小的」意思。厚革質的葉片互生，排列如扇狀。花自葉腋伸出，通常開一朵花，開花期不定。花朵黃色，花瓣有褐色斑紋、唇瓣有淺褐色斑紋。蕊柱兩旁有鬚狀像衣襟的構造，是與文心蘭差異較大之處 (Felix and Guerra, 2000)。扇葉蘭的分類位置多次調動，早期列為文心蘭屬 *Oncidium*，1972 年時將三個近似種獨立出來制定一個扇葉蘭屬 *Psycmorchis* 的新屬，2001 年又被合併到扇葉蘭屬(*Erycina*)。扇葉蘭染色體數為 5，而一般常見文心蘭亞族含 28 染色體。其細胞核基因組大小為 1.5 pg/1C nucleus (Chase *et al.*, 2005)，與其他文心蘭亞族 (1.1 - 1.93 pg/1C) 和蝴蝶蘭屬 (38 染色體) 蝴蝶蘭節植物基因組大小(1.37 - 1.57 pg/1C) (Lin *et al.*, 2001)的差異並不大。扇葉蘭植株很小，通常僅開一朵花，花色和花型都美麗。由於扇葉文心蘭具植株小型及短世代(6 個月)、可自交結種子、物種形成極為快速，因此與相關蘭科植物的基因差異極小、蘭科植物中最少染色體數(2n=12)等特性。近年來，花卉分子生物學家已建議以扇葉文心蘭作為蘭科植物的“模式植物”，探討調節蘭花生長、開花及花器形成之功能性基因體的研究材料。

扇形文心蘭(*Erycina pusilla*)具植株小型及連續開中型典型的黃色文心蘭之特性，外形精緻顏色、鮮亮、佔用空間小，深得人們所喜愛；但目前僅透過實生苗繁殖，且只有黃花、且為單花、花期短等，在繁殖及育種方面尚有可改進的空間。目前文心蘭育種多採用傳統雜交選育，過程曠日廢時，有建立扇形文心蘭基因轉殖系統之必要。Fibrillin 為類胡蘿蔔素結合蛋白，與植物果實及花朵中之類胡蘿蔔素儲存成脂蛋白的構造有密切的關係 (Vishnevetsky *et al.*, 1996; 1999)。本研究嘗試建立扇形文心蘭之農桿菌基因轉殖系統，並探討 *fibrillin* 基因轉殖到扇形文心蘭的可行性。

材料與方法

一、植試驗材料

(一)、基因轉殖植物材料

本試驗以扇形文心蘭(*Erycina pusilla*)為基因轉移之試驗材料，植株種植於 25.5/23°C (D/N)，光週期為 16 小時之植物生長箱生長，澆水以水苔完全乾燥再澆為主。無菌播種則是將扇形文心蘭授粉後四個月之果莢，以 70%酒精搖晃清洗數十秒，移除 70%酒精後再以商業用漂白劑 Clorox 劇烈震盪 15 鐘，以無菌水洗滌三次，最後將整顆果莢沾附滿 90%酒精，以酒精燈點燃燒乾完成滅菌。將滅菌後之果莢剖開取種子播於 1/4 MS 培養基(1/4 MS 培養基含有 2% sucrose, 1 g/l peptone, 170 mg/l NaH₂PO₄, 8 g/l agar, pH 5.2)，培養於 27/27 °C (D/N)，光強度為 150 μE/m²·Sec，16 小時光周期之環境下生長。於二至三個月後繼代第一次，之後每個月繼代一次於 1/4 MS 培養基。取約 2 至 3 mm 原球體或擬原球體為農

桿菌基因轉殖之材料。

(二)、葉綠體基因轉殖載體

本試驗轉殖的載體有 3 種，分別為：p1304-Fib (圖 1A)、p1304-Fib-IN (圖 1B)、p1304-API-Fib-IN (圖 1C) (林等, 2012)。p1304-Fib 上攜帶有 *CaMV35S* 啟動子及 *fibrillin* 基因；p1304-Fib-IN 及 p1304-API-Fib-IN 上攜帶有 *fibrillin* 基因及其反向重複基因分別構築於 *CaMV35S* 啟動子及 *API* 啟動子，*CaMV35S* 啟動子是在植物中強及持續性表現的啟動子，*API* 啟動子則是專一表現於花朵的啟動子。三種載體上均攜帶有 *mgfp5-gusA* 報導基因及 *hptII* 篩選基因，方便以 hygromycin 篩選轉殖培植體及早期以 GFP 螢光與 GUS 染色偵測。

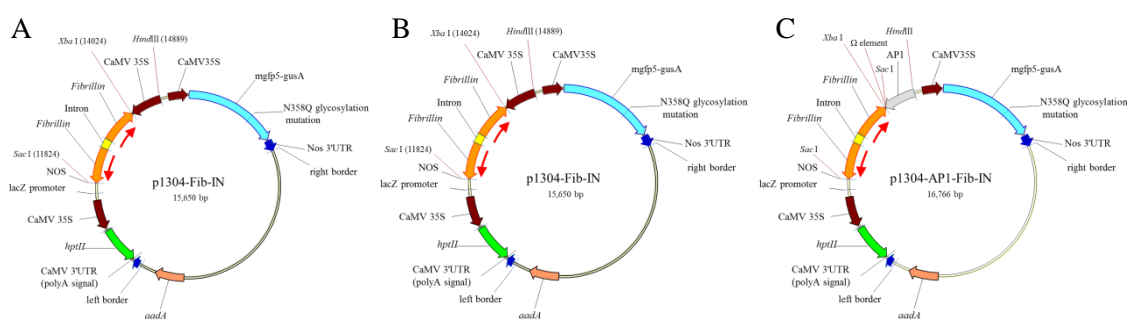


圖 1. 農桿菌轉殖載體 p1304-Fib(A)、p1304-Fib-IN(B) 及 p1304-API-Fib-IN(C) 之基因圖譜。
Fig. 1. Genetic maps of *Agrobacterium* transformation vectors p1304-Fib(A), p1304-Fib-IN(B), and p1304-API-Fib-IN(C).

二、實驗方法

(一)、扇形文心蘭之農桿菌基因轉殖

將培養好的農桿菌液倒入 50 ml 離心管中 5,000 g 離心 10 分鐘，去除上清液倒入 20 ml 感染液 (1/4 MS, 2% sucrose, 1 g/l peptone, 170 mg/l NaH_2PO_4 , 1 g/l 金剛砂, 0.2 mM AS, pH 5.2)，再將扇形文心蘭原球體夾入離心管中，於 VORTEX 上劇烈震盪 30 秒後，置於 28°C 搖晃暗培養 30 分鐘。倒掉感染液，將原球體夾出置於滅菌擦手紙上靜置 3 分鐘，吸去多餘液體，將原球體散布於共同培養基 (co-cultivate medium, CCM) (1/4 MS, 2% sucrose, 1 g/l peptone, 170 mg/l NaH_2PO_4 , 1 mg/l TDZ, 0.2 mg/l NAA, 0.2 mM AS, 8 g/l agar, pH 5.2)，於黑暗 28°C 之環境下共培養三天。將原球體移至新的培養皿中，加入含有 250 mg/l cefotaxime 的無菌水 25 ml 漂洗 10 分鐘共三次，置於無菌擦手紙上 3 分鐘，吸去多餘液體。接著移

至含有 250 mg/l cefotaxime 及 5 mg/l hygromycin 的 PLB 誘導培養基(PLB induction medium, PIM) (1/4 MS, 2% sucrose, 1 g/l peptone, 170 mg/l NaH₂PO₄, 1 mg/l TDZ, 0.2 mg/l NAA, 8 g/l agar, pH 5.2)進行篩選。

(二)、扇形文心蘭再生與篩選

感染後之培植體於含有 hygromycin 之 PIM 培養基篩選並每個月繼代一次，共三個月。篩選過程中，未經轉殖成功之培植體會慢慢白化、褐化並死亡，反之轉殖成功之培植體則保持綠色，持續生長誘導出 PLB 或形成芽體。經過篩選三個月後，將培植體移到芽體誘導培養基(shoot induction medium, SIM) (1/4 MS, 2% sucrose, 1 g/l peptone, 170 mg/l NaH₂PO₄, 8 g/l agar, pH 5.2)，使其芽體生長發育成植株，每個月繼代一次。

(三)、扇形文心蘭轉殖植株之檢測

1. 偵測 *fibrillin* 及 *GUS* 基因所使用之引子(primer)

偵測 *fibrillin* 基因之 1.0 kb 全長基因片段之引子為 forward primer : 5'GGT ACCATGG CTCCATCTCTTCT3'(A1) 與 reverse primer : 5'GAGCTCTTAAGGCTT CAAGAGGGG 3' (A2)。偵測內源性 *fibrillin* 基因之 0.5 kb 片段長之引子為 forward primer : 5'GGCAAGTGGA TTCTAGCGTACAC3'(A5) 與 reverse primer : 5' TCTAGATTAAGTCAAGAGAGGGCT3' (A4)。偵測 *GUS* 基因之 1.6 kb 片段長之引子為 forward primer : 5'CCCTTATGTTACGTCCTA TAGAAACCC3'(A6) 與 reverse primer : 5' TTGATTGTTTGC CTCCTGCTGCGG3'(A7)。

2. 聚合酵素連鎖反應

採用 Thermo Hybaid 儀器進行 PCR 分析。PCR 反應液之總體積為 25 μ l，內含 Taq buffer(1x)，2.5 mM dNTPs，5 unit Taq，1 μ M primer 和 100 ng 之轉殖與未轉殖株扇形文心蘭 DNA。偵測 *fibrillin* 基因的 PCR 反應條件為：95.0 $^{\circ}$ C(3 分鐘)，1 個 cycle，再進行 95.0 $^{\circ}$ C (30 秒)、55.0 $^{\circ}$ C(30 秒)、72.0 $^{\circ}$ C (30 秒)，共 35 個 cycle，最後進行 72.0 $^{\circ}$ C(10 分鐘) 1 個 cycle。偵測內源性 *fibrillin* 基因的 PCR 反應條件為：95.0 $^{\circ}$ C(3 分鐘)，1 個 cycle、再進行 95.0 $^{\circ}$ C (30 秒)、30.0 $^{\circ}$ C(30 秒)、72.0 $^{\circ}$ C(30 秒)，共 35 個 cycle，最後進行 72.0 $^{\circ}$ C(10 分鐘)，1 個 cycle。偵測 *GUS* 基因的 PCR 反應條件為：95.0 $^{\circ}$ C(3 分鐘)，1 個 cycle、再進行 95.0 $^{\circ}$ C (30 秒)、60 $^{\circ}$ C(30 秒)，72.0 $^{\circ}$ C(1 分鐘)，共 35 個 cycle，最後進行 72.0 $^{\circ}$ C(10 分鐘)，1 個 cycle。終產物以 1%之洋菜膠進行電泳分析。

3. 植物組織 RNA 之萃取

將萃取植物 DNA 所移出之 RNA 水層加入 250 μ l 異丙醇及 250 μ l PS & PG Removal Solution，以手搖晃混合均勻，室溫靜置 10 分鐘。於 4 $^{\circ}$ C 離心 12,000 g 10 分鐘並去除上清液，加入 1 ml RNA 用 75%酒精懸浮漂洗 RNA 沉澱物，於 4 $^{\circ}$ C 離心 12,000 g 5 分鐘並去除上清液，倒立風乾 5~10 分鐘，加入 100 μ l DEPC 水，於 65 $^{\circ}$ C 水浴鍋回溶 20 分鐘，存於-80 $^{\circ}$ C 備用

4. 反轉錄聚合酵素連鎖反應(RT-PCR)

本試驗使用 Fermentas 公司 RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit。反

轉錄反應 (First strand reaction) 的反應步驟:加入 0.01~5 µg RNA 及 1 µL oligo (dT) primer solution, 最後加入 DEPC 水至 12 µL, 充分混合於 65°C 作用 5 分鐘後置於冰上冷卻。再依序加入 4 µL reaction buffer、1 µL RNase Inhibitor、2 µL 10mM dNTP mix、1 µL Reverse Transcriptase, 充分混合於 42°C 作用 1 小時, 之後再移到 70°C 作用 5 分鐘, 即為 cDNA, 保存於-20°C。PCR 增幅採用 Thermo Hybaid 儀器來進行, PCR 反應液之總體積為 25µL, 內含有 2µL (1:1000 dilution) cDNA、1µL primer solution、4µL 2.5mM dNTP mix、2.5µL PCR buffer、*Taq* DNA polymerase, 加入 DEPC 水至 25µL, 充分混合後進行 PCR 反應。偵測 *fibrillin* 基因的 PCR 反應條件為: 95.0°C (3 分鐘), 1 個 cycle、再進行 95.0°C (30 秒), 55.0°C (30 秒), 72.0°C (30 秒), 共 35 個 cycle, 最後進行 72.0°C (10 分鐘), 1 個 cycle。偵測 *CHRC* 基因的 PCR 反應條件為: 95.0°C (3 分鐘), 1 個 cycle、再進行 95.0°C (30 秒), 50.0°C (30 秒), 72.0°C (30 秒), 共 35 個 cycle, 最後進行 72.0°C (10 分鐘), 1 個 cycle。偵測內源性 *fibrillin* 基因的 PCR 反應條件為: 95.0°C (3 分鐘), 1 個 cycle、再進行 95.0°C (30 秒), 30.0°C (30 秒), 72.0°C (30 秒), 共 35 個 cycle, 最後進行 72.0°C (10 分鐘), 1 個 cycle。終產物以 1% 之洋菜膠進行電泳分析。

(四)、GUS 活性之組織化學染色法 (GUS histochemical staining)

將配置好的 GUS 分析緩衝液[100 mM sodium phosphate (pH 7.0)、10 mM Na₂EDTA、0.5 mM K₃Fe(CN)₆ (potassium ferrocyanide)、0.5 mM K₄Fe(CN)₆ (potassium ferrocyanide)、0.1% Tritone X-100、10% MeOH、0.3% X-Gluc (5-bromo-4-Chloro-3-indoylglucuronid)]分裝於小玻璃管中, 再將試驗植株的組織, 完全浸漬於上述的 GUS 分析緩衝溶液中, 真空抽氣 10 分鐘, 恢復置一般氣壓, 再次抽真空 10 分鐘, 使 GUS 分析緩衝溶液能完全進入植物組織中, 靜置於 37°C 培養箱中暗處理 12-16 小時, 取出後以 70% 酒精逐次褪去組織葉綠素, 若有 GUS 蛋白表現之植物組織, 便會呈現具有 GUS 活性的藍色反應。

(五)、GFP 綠色螢光分析

選取轉殖以及未轉殖(CK)之轉殖扇形文心蘭, 置於配備有螢光燈源(Nikon HB-10101AF)與螢光濾鏡組 (Nikon DM 510, B-2A, BA520)的顯微鏡 (Nikon DIAPHOT)下, 進行觀察 mGFP 螢光。

結 果

一、Hygromycin 對扇形文心蘭 PLB 之生長與增殖的影響

本研究將不同濃度之 hygromycin (0~10 mg/l) 添加於 PLB 誘導培養基中, 於一個月後調查其存活率, 以建立篩選轉殖扇形文心蘭之最佳 hygromycin 濃度。在圖 2A 為扇形文心蘭培植體於含有 hygromycin 的培養基中培養三十天後之情形。隨著抗生素濃度的增加, 培植體的死亡也隨之增加。Hygromycin 濃度 2.5 mg/l 時培植體的存活率便有明顯的下降 (26.7%), 濃度增加至 5 mg/l 時存活率降至 20%, 在最高濃度 10 mg/l 時, 只有 11.7% 的培

殖體能存活下來(圖 2B)。為了在篩選過程中篩掉 80%的培植體數，因此本研究使用 hygromycin 5 mg/l 做為之後的篩選濃度。

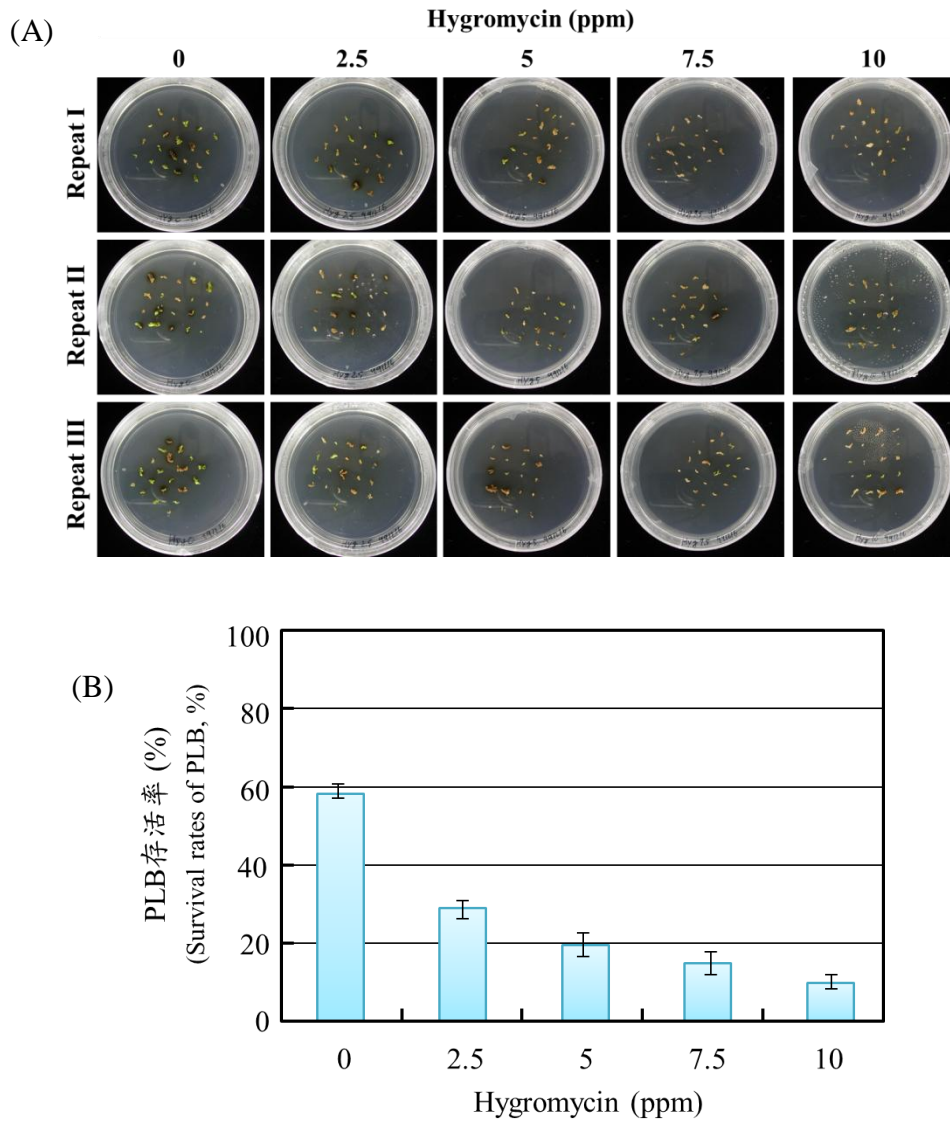


圖 2. Hygromycin 對扇形文心蘭 PLB 之生長與增殖的影響。PLB 置於含有不同濃度 hygromycin 的 PLB 誘導培養基中生長 30 天，調查其成活率。

Fig. 2. Effects of hygromycin on the growth and proliferation of *Erycina pusilla*. PLB survival rates were investigated after 30 days of PLB grown on the induction medium containing different concentration of hygromycin.

二、不同農桿菌菌系對轉殖效率之影響

比較農桿菌 GV3101、LBA4404 及 EHA105 三種菌種對扇形文心蘭原球體使用農桿菌媒介轉殖法之效率。經過農桿菌感染後，以 hygromycin 5 mg/l 篩選一個月後，進行 GUS 活性組織化學染色分析(圖 3A)，並觀察計算表現 GUS 之原球體的百分率(圖 3B)。結果顯示，以 GV3101 的感染效率最佳，47 個樣本中有 21 個有 GUS 反應，高達 47.25% 的 GUS 表現率，其次為 EHA105 的 12.1%，而 LBA4404 的 9.7% 表現率為最差。顯示 GV3101 菌種較適合扇形文心蘭原球體轉殖之用。

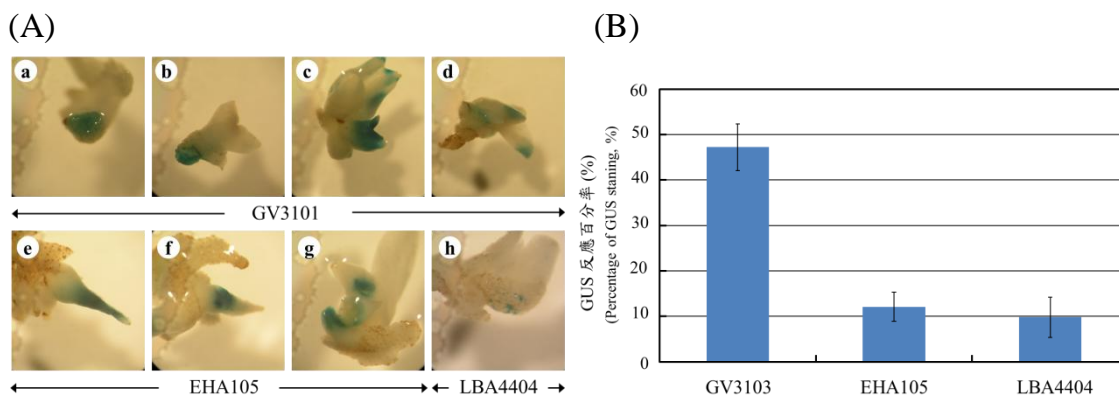


圖 3. 不同農桿菌菌系感染扇形文心蘭培植體後，進行 GUS 活性染色分析之情形(A)及 GUS 藍色反應的百分率(B)。Agrobacterium tumefaciens GV3103 (Aa~d)、EHA105 (Ae~g) 及 LBA4404 (Ah) (pCAMBIA 1301). 感染扇形文心蘭培植體，以 hygromycin 篩選一週後，進行 GUS 活性染色分析。

Fig. 3. Effects of inoculation of *Erycina pusilla* explants with different *Agrobacterium* strains on GUS blue response (A) and percentage of GUS staining (B). GUS analysis was performed after inoculation with *Agrobacterium tumefaciens* GV3103 (Aa~d), EHA105 (Ae~g), and LBA4404 (Ah) (pCAMBIA 1301) and followed by selected with hygromycin for one week.

三、農桿菌基因轉殖之扇形文心蘭培植體的篩選、誘導及植株再生

本研究使用農桿菌媒介轉殖法，進行轉殖 p1304-Fib、1304-Fib-IN 及 p1304-AP1-Fib-IN 等三種載體的扇形文心蘭基因轉殖。所使用的 PLB，取扇形文心蘭果莢無菌播種於 1/4 MS 培養基三到四個月後的原球體及 PLB 為材料(圖 4A、B 及 C)。將 PLB 與含有金剛砂的感染液混合，經由強力震盪 30 秒造成刻傷後，於 28°C 搖晃暗培養 30 分鐘，放置於固體 CCM 培養基上，避光 28°C 之環境下培養 3 天(圖 4D)。共培養 3 天後(圖 4E)，以含有 250 mg/l

cefotaxime 的無菌水 25 ml 漂洗 10 分鐘共三次以殺死農桿菌。再將感染後之培植體移至含有 250 mg/l cefotaxime 及 5 mg/l hygromycin 的 PLB 誘導培養基(PIM)(圖 4F)。之後每一個月繼代篩選一次共三個月(圖 4G、H 及 I)，篩選過程中未轉殖的培植體會褐化或白化死亡，而疑似轉殖培植體則維持綠色。三個月後將存活之培植體移置芽體誘導培養基(SIM)，使其芽體生長發育成植株，每個月繼代一次。

四、轉殖培植體之 GFP 及 GUS 活性分析

取農桿菌法轉移之扇形文心蘭培植體，以螢光顯微鏡檢測其組織，在藍光照射下未經 GFP 濾鏡過濾下，在轉殖培植體上可以看見因混合葉綠體紅光及 GFP 綠光而呈現紅黃參雜的情況(圖 5B、C)，而未轉殖培植體則僅呈現葉綠體散發的紅光(圖 5A)。以藍光照射經 GFP 濾鏡後，可看見轉殖培植體發散綠色螢光(圖 5E 及 F)，而未轉殖對照組(CK)則未見綠色螢光表現(圖 5D)。轉殖之培植體經過 1.5 個月篩選後，進行 GUS 活性染色分析，成功偵測到 GUS 藍色反應(圖 6A)，而未轉殖對照組則沒有任何表現(圖 6B)。

五、轉殖培植體之基因及表現分析

萃取篩選之扇形文心蘭培植體的總 DNA，經 PCR 方式以引子 A1 及 A2 偵測是否含有 *fibrillin* 基因。分析結果顯示，經電泳膠片分離 PCR 產物後，在 p1304-Fib、p1304-Fib-IN 及 p1304-AP1-Fib-IN 的培植體 DNA 均可增幅出預期的 1.0-kb 的 *fibrillin* 的片段，而對照組(CK)則無(圖 7A)，此 1.0-kb 的 DNA 區域是涵蓋 *fibrillin* 基因的全長片段。以 A6 及 A7 經 PCR 偵測是否還有 *GUS* 基因，分析結果顯示，經過電泳膠片分離 PCR 產物後，均有檢測到預期的 1.6-kb 的 *GUS* 片段，而對照組(CK)則無(圖 7B)。

萃取篩選後之扇形文心蘭培植體的總 RNA，進行 RT-PCR 分析，以檢測轉殖培植體表現 *fibrillin* 及 *GUS* 之 mRNA 的情形。分析結果顯示，以 A1、A2 引子偵測 *fibrillin* 基因，僅轉殖 p1304-Fib 之培植體有 mRNA 的表現，電泳膠片有預期的 1.0-kb 片段，其它轉殖載體(p1304-Fib-IN、p1304-AP1-Fib-IN)及對照組(CK)均未檢測到 mRNA 之表現(圖 8A)。以 A6、A7 為引子偵測 *GUS* 基因，結果所有轉殖培植體均可檢測到 *GUS* 基因的 mRNA 表現，而對照組(CK)則無(圖 8B)。以 A4、A5 引子偵測內源性 *fibrillin* 基因，結果顯示所有轉殖培植體及對照組(CK)均可檢測到內源性 *fibrillin* 基因的 mRNA 表現，顯示總 RNA 萃取並無問題(圖 9)。

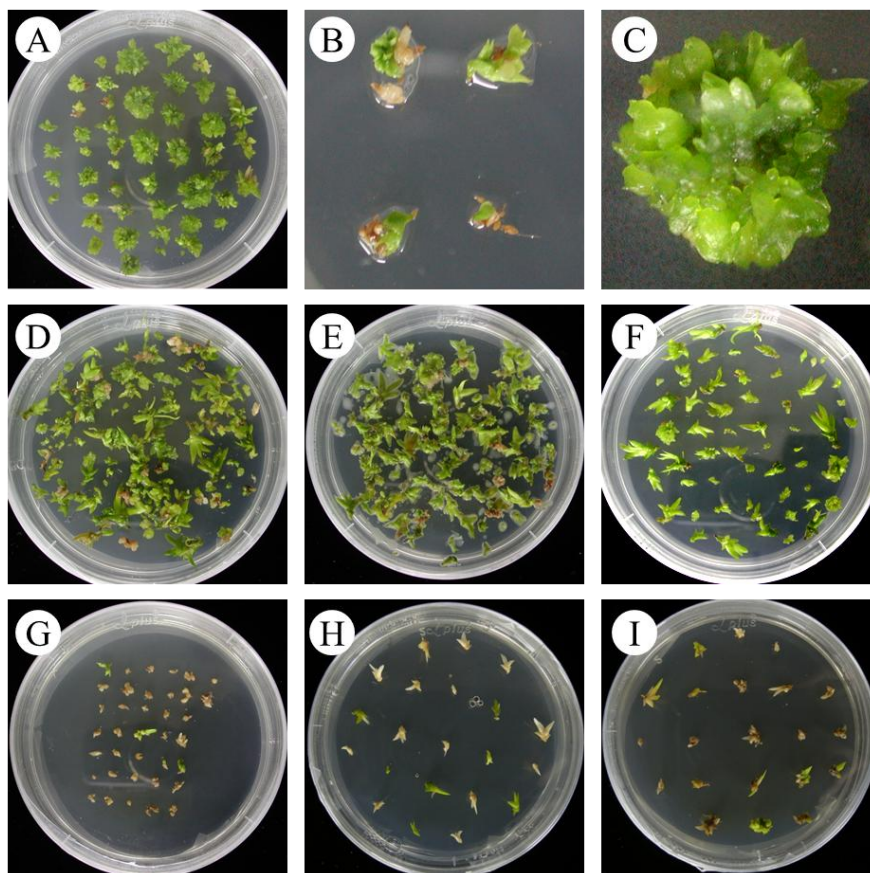


圖 4. 扇形文心蘭之農桿菌感染流程。(A) 扇形文心蘭種子於 PIM 培養基上誘導原球體與 PLB 之生長情形；(B~C) 扇葉文心蘭之 PLB；(D) PLB 與農桿菌共培養於 CCM 培養基 3 天後形；(E) 以含有 250ppm cefotaxime 的無菌水進行漂洗；(F) 培植體於 SM 培養基進行篩選；(G~I) SM 培養基篩選一、二、三個月後之生長情形。

Fig. 4. Process of *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of *Erycina pusilla*. (A) *Erycina pusilla* seeds were germinated *in vitro*. (B~C) Protocorm-like bodies of *Erycina pusilla* were induced from seeds. (D) The explants were incubated in co-culture medium (CCM) with *Agrobacterium* suspension for 3 days. (E) Appearances of explants after 3 days of co-cultivation. (F) The explants were washed in sterile water containing 250 mg/l cefotaxime to remove excess *Agrobacterium*. (F) Transformed explants were selected on SM medium containing 5 ppm hygromycin. (G~I) Transformed explants cultivated in SM medium after 1, 2, 3 months, respectively.

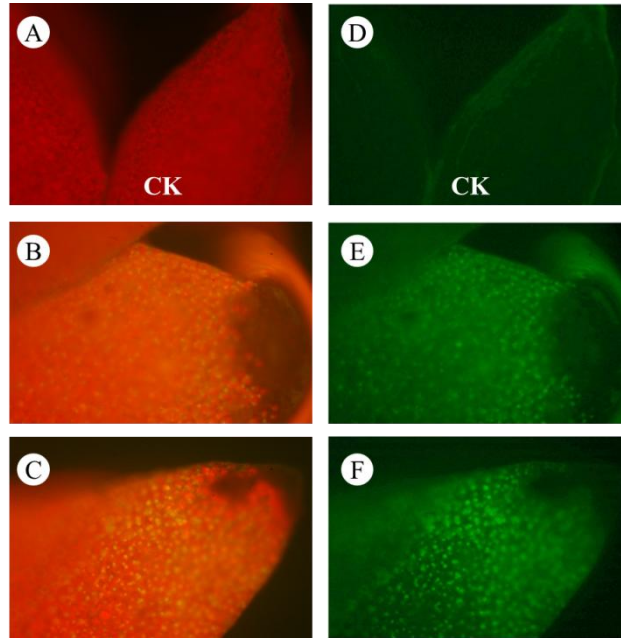


圖 5. 以倒立螢光顯微鏡觀察扇形文心蘭培植體篩選一個月後之 GFP 螢光表現。(A) 未轉殖培植體於 494~518 nm 濾鏡下之情形。(B、C) 轉殖培植體於 494~518 nm 濾鏡下之情形。(D)未轉殖培植體於 GFP 濾鏡下之情形。(E、F) 轉殖培植體於 GFP 濾鏡下之情形。

Fig. 5. Fluorescence analysis of egfp expression in the tissues of *Erycina pusilla* PLB after 1 month of hygromycin selection. (B, C, E and F) and un-transformed (A and D). A, B, C: observed under the 494~518 nm light. D, E, F: observed under GFP filter.

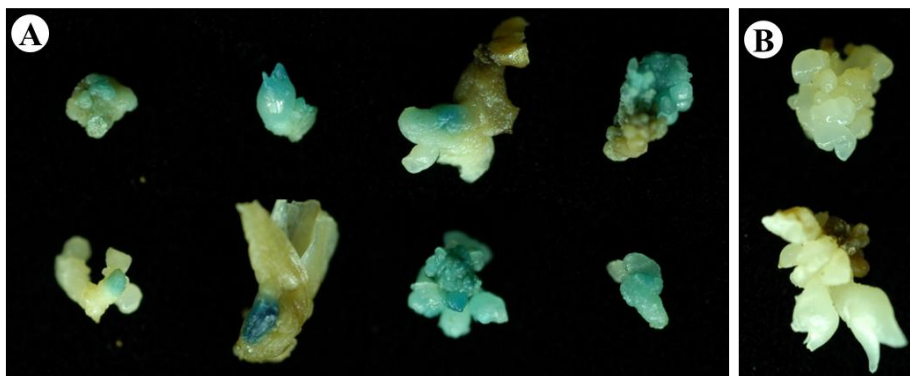


圖 6. 轉殖扇形文心蘭培植體 (A) 及對照組(B)，進行 GUS 活性染色分析之情形。

Fig. 6. Gus histochemical staining of the transformed (A) and untransformed (B).*Erycina pusilla* explants.

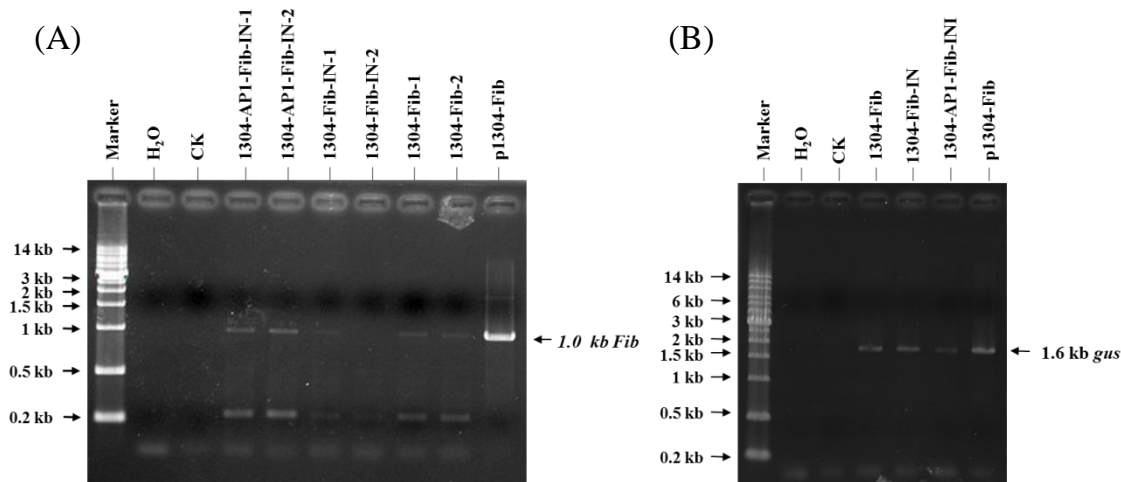


圖 7. 轉殖扇形文心蘭培植體，分別以 A1/A2 (A)、A6/A7 (B) 為引子，經 PCR 分析 *fibrillin* (A) 及 *GUS* (B) 基因，其產物在電泳膠片上分離的情形。

Fig. 7. PCR analysis of *fibrillin* (A) and *GUS* (B) gene in transformed *Erycina pusilla* explants.

The part of *fibrillin* (A) and *GUS* (B) gene sequence was amplified from *Erycina pusilla* DNAs using A1/A2 (A) and A6/A7 (B) as primers, and analyzed by electrophoresis. CK : untransformed *Erycina pusilla*.

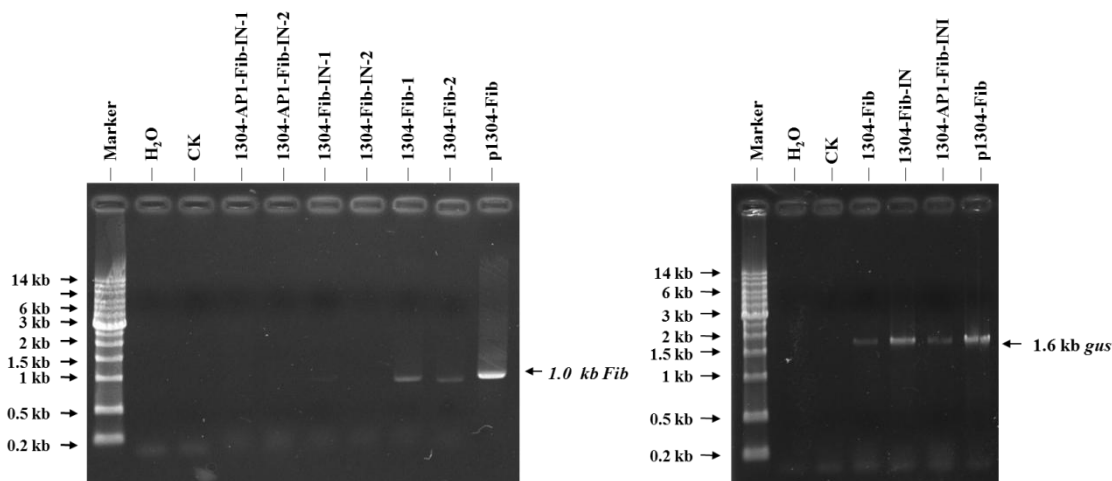


圖 8. 轉殖扇形文心蘭培植體，分別以 A1/A2 (A)、A6/A7 (B) 為引子，經 RT-PCR 分析 *fibrillin* (A) 及 *GUS* (B) mRNA，其產物在電泳膠片上分離的情形。

Fig. 8. RT-PCR analysis of *fibrillin* (A) and *GUS* (B) mRNA in transformed *Erycina pusilla* explants. The part of *fibrillin* (A) and *GUS* (B) mRNA was amplified from *Erycina pusilla* mRNA using A1/A2 (A) and A6/A7 (B) as primers, and analyzed by electrophoresis. CK : un-transformed *Erycina pusilla*.

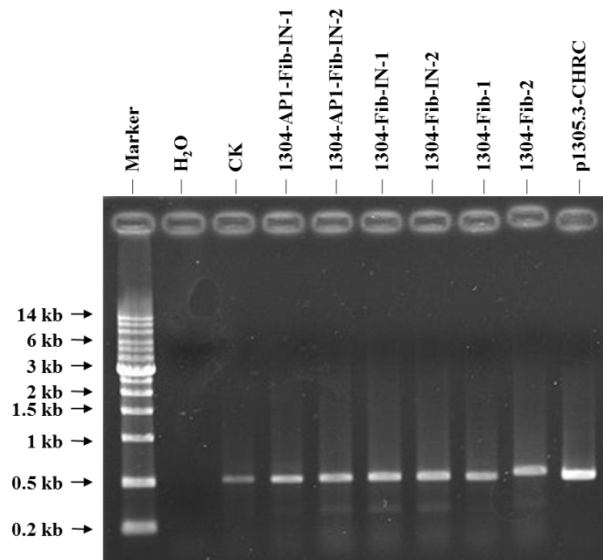


圖 9. 轉殖扇形文心蘭培植體以 A4、A5 為引子，經 RT-PCR 分析內源 *fibrillin* mRNA，其產物(0.5 kb)在電泳膠片上分離的情形。

Fig. 9. RT-PCR analysis of endogenous *fibrillin* mRNA in transformed *Erycina pusilla* explants after 3 month selection. The part of endogenous *fibrillin* mRNA (1.0 kb) was amplified from *Erycina pusilla* mRNA using A4 and A5 as primers, and analyzed by electrophoresis. CK : un-transformed *Erycina pusilla*.

討 論

本研究使用農桿菌(GV3101)對扇形文心蘭進行 p1304-Fib、1304-Fib-IN 及 p1304-API-Fib-IN 等三種載體的基因轉殖。材料來源為扇形文心蘭果莢無菌播種後三到四個月的原球體及 PLB 為材料。由於 PLB 與圓球體培養過久會有玻璃質化的問題，而玻璃質化的材料在經過農桿菌感染後，不經篩選便會大量死亡，因此應盡量避免使用玻璃質化的材料進行轉殖。PLB 經金剛砂強力震盪 30 秒造成刻傷後，在 28°C 搖晃暗培養 30 分鐘，之後放置於固體共培養基上避光培養 3 天。以含有 250 mg/l cefotaxime 的無菌水漂洗以殺死農桿菌。再將培植體移至含有 250 mg/l cefotaxime 及 5 mg/l hygromycin 的 PLB 誘導培養基(PIM)進行篩選，並每一個月繼代篩選一次共三個月。在許多研究中 carbenicillin 被用來殺滅農桿菌，但此抗生素的降解時間極快(4°C，72 小時)，對於蘭科每個月繼代的週期而言，carbenicillin 極短的有效作用期限，在後期並無法壓制農桿菌的復發，勢必會造成材料的死亡及人力的消耗，若添加大量抗生素則會增加培植體於篩選時的死亡率。因此本

試驗使用降解速度較慢的 cefotaxime (常溫，三星期)來減少農桿菌之復發，在使用量上不建議超過 250 mg/l，以免減少培植體篩選時的存活率。篩選過程中 hygromycin 在蛋白合成過程中會液置胍肽鍊的延長，進而導致為轉殖細胞的死亡，未轉殖培植體因此而褐化或白化死亡，而疑似轉殖培植體則維持綠色並繼續生長。

本研究利用螢光顯微鏡進行初步檢測，在藍光照射下未經 GFP 濾鏡過濾下，擬轉殖培植體因混合葉綠體紅光及 GFP 綠光而表現紅黃參雜的情形，而未轉殖者僅表現葉綠體紅光。加裝 GFP 濾鏡後擬轉殖培植體發散綠色螢光，而未轉殖對照組(CK)則未見綠色螢光表現。進一步利用 GUS 活性染色分析做確認，篩選三個月的擬轉殖培植體(p1304-Fib 及 p1304-Fib-IN)可以見到點狀的 GUS 表現。由 GUS 表現的方式了解到，目前的轉殖方式大多產生嵌合體，因此有必要對轉殖方式進行修改，若能仿照菸草等模式植物直接以葉切片作為感染材料，並於誘導時進行篩選或許能降低嵌合體的發生率。

本試驗萃取篩選 3 個月後之扇形文心蘭培植體的總 DNA，經 PCR 方式以引子 A1 及 A2 偵測 *fibrillin* 基因。結果顯示在 p1304-Fib、p1304-Fib-IN 及 p1304-AP1-Fib-IN 的培植體 DNA 均可增幅出預期的 1.0-kb 的片段，此 1.0-kb 的 DNA 區域是涵蓋 *fibrillin* 基因的全長片段，所以確認各培植體均帶有 *fibrillin* 基因。再以 A6 及 A7 經 PCR 偵測 *GUS* 基因，結果同樣顯示所有培植體均有預期的 1.6-kb 的 *GUS* 片段。

為了解基因表現情形，繼續萃取篩選 3 個月後之扇形文心蘭培植體的總 RNA，對 *fibrillin* 及 *GUS* 之 mRNA 進行 RT-PCR 檢測。結果顯示，以 A1、A2 引子偵測 *fibrillin* 基因，僅轉殖 p1304-Fib 之培植體有 mRNA 的表現，電泳膠片有預期的 1.0-kb 片段，其它轉殖載體(p1304-Fib-IN、p1304-AP1-Fib-IN)均未檢測到 mRNA 之表現，此結果也符合所預期之情況。P1304-Fib-IN 因帶有反向重複結構，因此所表現之 mRNA 會因形成髮夾結構而被降解，所以 RT-PCR 無法偵測到其 mRNA。而 p1304-AP1-Fib-IN 則因為使用的啟動子為花朵專一表現，在綠色培植體中所構築的基因是無法被啟動的，同樣也無法檢測到其 mRNA 表現。僅轉殖過量表現載體(p1304-Fib)之培植體能被檢測到其基因 mRNA。以 A6、A7 引子偵測 *GUS* 基因的 mRNA，結果所有轉殖培植體均可檢測到 *GUS* 基因的 mRNA 表現，顯示轉殖基因是能在植物體中正常轉錄。再以 A4、A5 引子偵測內源性 *fibrillin* 基因，結果顯示所有轉殖培植體及對照組均可檢測到內源性 *fibrillin* 基因的 mRNA 表現，顯示總 RNA 萃取過程並無問題。

參 考 文 獻

- Chase, M. W., L. Hanson, V. A. Albert, W. M. Whitten, and N. H. Williams. 2005. Life history evolution and genome size in subtribe Oncidiinae (Orchidaceae). *Ann. Bot.* 95: 191-199.
- Felix P. and M. Guerra. 2000. Cytogenetics and cytotaxonomy of some Brazilian species of cymbidioid orchids. *Genet. Mol. Biol.* 23: 957 – 978.
- Lin, S., H. C. Lee, W. H. Chen, C. C. Chen, Y. Y. Kao, Y. M. Fu, Y. H. Chen, and T. Y. Lin. 2001. Nuclear DNA Contents of *Phalaenopsis* sp. and *Doritis pulcherrima*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126: 195-199.
- Lin, W. J., J. C. Yiu, F. C. Chen, and M. J. Tseng. 2012. Construction and application of over-expression and RNAi suppression vectors of *Fibrillin* and *CHRC* genes. *Horticulture NCHU* 37(2): 37-50;
- Vishnevetsky, M., M. Ovadis, and A. Vainstein. 1999. Carotenoid sequestration in plants: the role of carotenoid-associated proteins. *Trends Plant Sci.* 4: 232 – 235.
- Vishnevetsky, M., M. Ovadis, H. Itzhaki, M. Levy, Y. Libal-Weksler, Z. Adam, and A. Vainstein. 1996. Molecular cloning of a carotenoid-associated protein from *Cucumis sativus* corollas: homologous genes involved in carotenoid sequestration in chromoplasts. *Plnat J.* 10: 1111-1118.
- Williams, H. W., M. W. Chase, T. Fulcher, and W. M. Whitten. 2001. Molecular systematics of the Oncidiinae based on evidence from four DNA sequence regions: expanded circumscriptions of *Cyrtorchilum*, *Erycina*, *Otoglossum*, and *Trichocentrum* and a new genus (Orchidaceae). *Lindleyana* 16: 113 – 139.

Transforming *Fibrillin* Gene into *Erycina pusilla*

Wu-Jui Lin¹⁾ Jiun-Lin Chen²⁾ Chen Chang³⁾ Menq-Jiau Tseng⁴⁾

Key words: *Erycina pusilla*, *Fibrillin*, *Agrobacterium* mediated transformation

Summary

The aims are to establish the transformation technology of *Erycina pusilla*, and to explore the possibility of transforming *fibrillin* gene into *Erycina pusilla*. The over-expression (p1304-Fib) and RNAi (p1304-Fib-IN and p1304-AP1-Fib-IN) constructs of *fibrilli* gene under the control of CaMV 35S or AP1 promoter were transferred into the PLB of *Erycina pusilla* via *Agrobacterium*-mediated transformation. The transformed explants were selected with 5 ppm hygromycin. The regenerated plantlets were confirmed by PCR, RT-PCR and GUS histochemical staining. Results indicated that the *fibrilli* gene was present in the genome of transformed *Erycina pusilla* and expressed *fibrilli* mRNA. Furthermore, transformed *fibrilli* mRNA was non-detectable in the transgenic plantlets transformed with RNAi constructs.

-
- 1) Graduate student in M.S. Program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.
 - 2) Assistant Professor, Department of Landscape Architecture, Chung Chou University of Science and Technology.
 - 3) Associate Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.
 - 4) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.

