

以病毒誘導的基因靜默策略研究蘭花花部功能基因

謝明憲、陳虹樺*

¹成功大學生命科學系及²生物科技所

Email: hhchen@mail.ncku.edu.tw

Plant Physiology 143: 558-569 (2007)

台

灣的蝴蝶蘭產業，為我國最大宗的外銷花卉，更是政府重點培育

的精緻農業之一。台灣有兩種原生蝴蝶蘭：姬蝴蝶蘭為小形花，顏色

變化豐富；台灣原生白花蝴蝶蘭（市面上稱台灣阿嬤），其花形優

美，是目前花卉市場的主力品種。蝴蝶蘭染色體數目 $2n=38$ ，且基因

體大小約和人類的一樣大，生長週期長，從營養生長到生殖生長階段

通常約需2至3年的時間，影響了研究基因功能的進展。因此蘭花功能

基因的確認，最大的挑戰為研究生殖階段基因的功能。目前以遺傳學

方法進行功能性基因研究可以分為正向遺傳學(forward genetics)及反

向遺傳學(reverse genetics)兩種。正向遺傳學是從觀察到表型變化再

研究它的基因變化，而反向遺傳學則是從先找到基因再研究它可能

造成的表型變化。對於蘭科植物功能性基因的研究，難以使用正向遺傳

學策略的原因係由於蘭花世代長及缺乏完整的遺傳圖譜，而使用傳統

反向遺傳學策略，如T-DNA insertion或transposon tagging工具，則面臨蘭花基因轉殖效率低及有性繁殖

世代長。因此在這種不利的狀況下，蘭花功能性基因研究進展緩慢。所幸，近來新發展出另一項反向遺傳

學策略工具，即病毒誘導基因靜默(virus induced gene silencing, VIGS)策略，則不需透過有性繁殖世代及

複雜的基因轉殖操作，因此對於花部功能基因的研究是一項極有效率之工具。



病毒誘導基因靜默是一種利用重組病毒表達RNAi的策略，也就是以重組病毒感染植株後，利用病毒系統表達Hairpin-RNA重組基因序列，啟動RNAi效應。VIGS具有快速、高效率、高專一性的特點，適合作為功能基因體分析之工具。我們首先篩選出可供構築VIGS的蘭花病毒載體。目前成功被構築使用的VIGS的載體病毒，常見的有馬鈴薯X病毒(Potato virus X, PVX)及菸草嵌紋病毒(Tobacco mosaic virus, TMV)。從病毒分類上已知PVX及喜姆比蘭嵌紋病毒(*Cymbidium mosaic virus, CymMV*)均屬於Potexvirus，而TMV及齒蘭輪斑病毒(*Odontoglossum ringspot virus, ORSV*)則同屬於Tobamovirus。經篩選蘭花病毒所引起的病症及感染能力，最後篩選出以盛行於蘭花的*CymMV*作為構築VIGS的病毒載體。此載體經由重組插入控制葉綠素合成的*Phytoene desaturase (PDS)* 基因，再接種於蝴蝶蘭葉片3週後，經由即時定量real time RT-PCR檢測結果，發現PDS基因表達之RNA轉錄體明顯降低約54%，因此確認*CymMV*病毒載體可應用於蝴蝶蘭功能性基因研究。

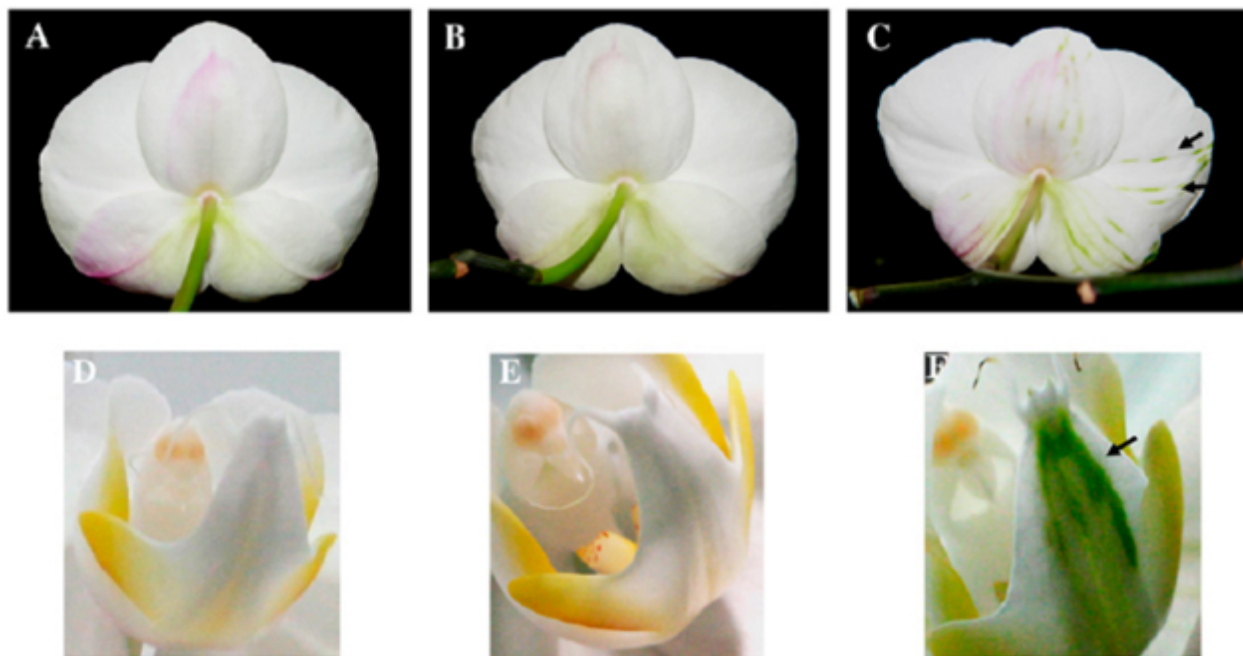
此外，為了加速以*CymMV*構築VIGS的病毒載體在蘭花花部基因之功能性研究，首先依照蘭花栽培業者低溫誘導開花方法，將供試材料置於低溫環境（白天25、夜晚20）誘導蘭株抽花梗，以維持週年有開花株可供試驗所需。為了測試*CymMV*載體在所有的花器是否皆能有基因靜默現象，我們選擇一個花部發育基因*PeMADS6*，為B-class MADS-box基因，利用基因序列近3'端的低保留性但較具高專一性之長約150個核苷酸序列，插入*CymMV*載體，以體外轉錄法(*in vitro* transcription)增殖病毒後接種於平均梗長約8公分，具6節花梗之台灣阿嬤抽梗株。經過6週，抽梗株開花後，比較接種病毒空載體(p*CymMV*-pro60)植株與接種含*PeMADS6*片段之病毒載體(p*CymMV*-pro60-*PeMADS6*IR)的基因靜默植株，經由即時定量real-time PCR檢測分析結果，顯示*PeMADS6*基因的轉錄分別被減少 $63\pm 2\%$ 、 $33\pm 3\%$ 、 $23\pm 5\%$ 及 $33\pm 2\%$

於萼瓣、花瓣，唇瓣及蕊柱，證實 *CymMV* 載體可抑制 *PeMADS6* 基因在蘭花不同花器之表現。

為了進一步確認 *PeMADS6* 基因表現量降低，是歸因於 VIGS 所誘導 RNA 干擾結果，藉由從接種蘭株抽取及純化的小分子的 siRNA (small interfering RNA)，應用 Northern blot 分析技術，以 *CymMV* Coat protein (CP) 基因或 *PeMADS6* 基因序列作成探針進行雜合偵測分析載體病毒之 *CymMV* CP 基因及 *PeMADS6* 基因在表達後 mRNA 被降解成 siRNA 的程度。分析結果顯示在接種病毒空載體 (p*CymMV*-pro60) 植株與接種含 *PeMADS6* 片段之病毒載體 (p*CymMV*-pro60-*PeMADS6*IR) 的基因靜默植株，二者均可被誘導產生 21 nts 長的 *CymMV* CP siRNA，然而僅有在 *PeMADS6* 基因靜默植株可偵測到 21 nts 長的 *PeMADS6* siRNA。證實 *PeMADS6* 基因的降解產生 21 nts 長的 siRNA 產生是具專一性，且藉由以 *CymMV* 構築 VIGS 病毒載體誘導基因靜默策略，可有效降低 *PeMADS6* 基因的表現量。此外，在 *PeMADS6* 基因靜默植株外表型發生變異，在花器的萼瓣、花瓣及唇瓣呈現綠化條狀或不規則綠色斑，有些接種試驗植株在花梗上端的花苞呈現前述外表型改變，但花梗下位的花苞則無法綻放，經由解剖觀察發現該花苞在花器的萼瓣、花瓣及唇瓣也呈現相同綠化的條狀或不規則綠色斑。這些觀察結果，證實降低蝴蝶蘭 *PeMADS6* 基因的轉錄量，雖然花苞在分化時的初期發育甚少受到影響，但後期發育則發育受到明顯阻礙。

本研究也在不同品種蝴蝶蘭材料：*P. amabilis* 及 *P. solo* Musadium，接種帶有 150 nts *PeMADS6* 基因序列之 *CymMV* (p*CymMV*-pro60-*PeMADS6*IR) 病毒載體，也產生相同的結果。由於該二個品種皆屬四倍體植物，一般的 loss-of-function 分析是難以在多倍體作物上執行，且若擬研究的基因具有多個拷貝數，用 loss-of-function 分析方法，如 T-DNA insertion 或 transposon tagging 技術，要同時標定具多個拷貝數的重複基因是相當困難。我們的結果顯示應用 *CymMV* 病毒載體之 VIGS 策略則可避開這二種問題，且可在植物體內不同部位，同時降解 RNA，而達成同步靜默該基因之表達。

本項研究證實以 *CymMV* 所構築的 VIGS 載體，是非常適合於在蝴蝶蘭分析花部發育基因的功能，且 *CymMV* 可廣泛性的感染在蘭科植物內不同屬植物，包含蝴蝶蘭屬 *Phalaenopsis*、蕙蘭屬 *Cymbidium*、加德利亞屬 *Cattleya*、石斛蘭屬 *Dendrobium*、*Epidendrum*、*Laelia*、*Laeliocattleya*、文心蘭屬 *Oncidium*、*Zygopetallum*、梵尼蘭屬 *Vanilla* 及萬代蘭屬 *Vanda* 等。因此以 *CymMV* 所構築的 VIGS 載體可應用前述不同屬的蘭花進行功能性基因研究。雖然目前蘭花功能性基因的研究已經有一些進展，但與其他農作物相比，還有距離。隨著花卉產業化步伐的加快，今後蘭花功能性基因方面的研究還需要更加速進行。而以 *CymMV* 所構築的 VIGS 載體將可適用於具大基因體、低基因轉殖效率及繁殖世代長的蘭花，因此對於研究蘭花功能性基因將是最佳選擇的利器。



圖一、MADS-box g 基因靜默植株表型。分別以緩衝液(A 及 D)，p*CumMV*-pro60 (B and E)，及

pCymMV-CP60-PeMADS6 (C and F)注射台灣阿嬤花梗的開花結果。(C)圖中箭頭表示花瓣中綠化條狀，及(F)圖中箭頭表示唇瓣中綠化條狀。

Copyright 2009 National Cheng Kung University