

成果報告

計畫名稱：香蕉萎縮病毒系統之基因體分析
與香蕉基因轉移

NSC89-2313-B-002-174

計畫主持人：台灣大學植病系 名譽教授 蘇鴻基

本研究計劃(「香蕉萎縮病毒系統之基因體分析與香蕉基因轉移」專題計劃)實施兩年，已約略達成初步設定的研究目標。經與加州大學戴維斯分校(UC Davis)植病系合作，改良式"農桿菌基因轉殖技術"已經成功轉移回台，完成基因轉殖載體之構築，應用於香蕉基因轉殖。因本實驗室已對香蕉萎縮病毒之基因研究有深厚基礎(Yeh et al., 1994; Su et al., 1999)，故與加大合作所做之技術轉移及研究工作之進行皆十分順利。唯因香蕉抗病性測定需較長期試驗，且溫室實驗與田間試驗要循階段依序進行，目前轉基因植物田間試驗需經國家核准才能實施，故目前尚處於溫室實驗階段。

一、背景簡介

香蕉萎縮病為台灣及其他香蕉生產國家極重要之病毒病害之一，香蕉萎縮病毒(BBTV)為球狀病毒，基因體單股環狀DNA，目前已知基因體DNA有6條以上(Burns et al., 1994)。幾乎所有香蕉品種皆受其危害，傳播途徑為無性繁殖體(吸芽、組織培養苗)與媒介昆蟲蕉蚜(*Pentalonia nigroverosa*)，而因其為病毒病害，故無藥可治，只能建立健康蕉苗制度及配合媒介昆蟲防治來達到預防的效果。若能利用漸已成熟之基因轉殖技術開發出抗BBTV蕉株，則可避免此病之嚴重危害。在今年度專題研究計劃中，我們已將第II型BBTV的DNA polymerase及coat protein基因DNA序列解出。為開發抗BBTV基因轉殖香蕉，擬利用gene silencing或cross protection原理，將DNA polymerase或coat protein基因殖入香蕉體內，使其產生抗性，用以防治香蕉萎縮病。

二、與加州大學合作前之國內研究成果

1. 選定最佳的香蕉試驗品種，進行組織培養訓練：與台灣香蕉研究所合作，取得目前最佳的香蕉栽培品種"218"(Cavendish AAA Banana cultivar)，改良組織培養技術。
2. 選殖標的基因：將標的基因DNA polymerase gene或coat protein gene予以定序，並利用PCR法大量增殖，以TA cloning方法植入載體內，經選殖後獲得DNA polymerase gene及coat protein gene。
3. BBTV系統頗複雜，根據病毒病徵表現及PCR分子鑑別，可將BBTV區分成6型(Su et al., 1999)，其中第二型在台灣及世界其他地區是最普遍且嚴重者。
4. 對BBTV嚴重型的第一、第二與第三型之component 1基因作定序，確立ORF位置，並獲得各類型之專一性引子對。

三、與加州大學合作之研究成果報告

在美期間(約60天)，經過密集之基因轉殖訓練後，已將香蕉的基因轉殖載體構築完成，並攜回國內，且將標的基因植入香蕉中。在美期間，透

過 Dr. Kado 協助，獲得四種載體與四個農桿菌株，皆為基因轉殖所必需。為能熟練此轉殖技術，在考慮時效因素下，特以較能簡單操作的植物（阿拉伯芥），練習整套流程，並且獲致成功。香蕉組織培養耗時，抗病性評估需較長時間，故目前試驗仍進行中，但加大之基因轉殖技術已經成功移植回國內，在此特將其技術訓練過程與試驗成果敘述如下：

1. 載體的選定與增殖：

在參考相關文獻並與加大合作之學者 Dr. Kado 討論後，決定選擇該實驗室於 1990 年研發之 T-vector，即 pUCD 2340 (Zyprian & Kado, 1990; Okumura et al., 1992) 做為轉殖載體，並再選定 pBI 121 (商品化之 T-vector) 做一對照。pUCD 2340 較商品化的 pBI 121 多了兩項優點：(1) 有較多的 cloning sites，可用 Cla I、BamHI、Xba I、Xho I、Sma I、Sal I 等限制酵素進行選殖 (pBI 121 只有 BamHI、Xba I、Sma I)；(2) 有抗 hygromycin 基因，篩選時更為方便。兩種 T-vectors 皆為 binary vector，可在 *E. coli* 及 *Agrobacterium tumefaciens* 增殖，因此選殖工作即可利用一般 *E. coli* system 進行。為獲致大量 T-vector，將含有 T-vector 的 *E. coli* (HB 101) 做培養，並用純化管柱 (QIAGEN) 將質體純化，獲得約 500 ug T-vector，以便進行下一步實驗。

2. 以 PCR 法增殖標的基因：

根據已知 BBTV componenet 1 的 DNA 序列，選定一引子對：BTUCD1-F：5'-TCA TCG ATA GAA TGG CGC GAT ATG TG-3'；BTUCD1-R'：5'-AGT CTA GAC TTG TTC AGC AAG AAA CC-3'，以純化的 BBTV-DNA 為 template 進行增幅反應，結果如預期產生約 900 bp 長的 DNA polymerase gene 增殖片段。PCR 產物經迷你管柱 (Roch) 純化後，以 Cla I 及 Xba I 兩限制酵素作用後，植入 T-vector 中。為確認 PCR 產物之精確性，先將 PCR 產物植入 TA cloning vector (pCRII) 中，而將之定序確認無誤後才應用於基因轉殖。定序後發現增殖片段正確長度為 885 bp (序列如圖 1 所示)，經 BLAST 比對，與目前發表於 Genbank 的所有 BBTV-component 1 (polymerase gene) (Burns et al., 1995) 皆有 98% 以上之相似度。

3. T-vector 的構築與選殖：

如前所述，以 Cla I 及 Xba I 分別作用 T-vector 與標的基因增殖片段，再以 T-4 DNA ligase 再黏合，並移入 *E. coli* HB 101 competent cells 中進行選殖。在含 Kanamycin 的 LB 培養基上挑選菌落，進行 minipreparation，再以上述引子對進行 PCR 增殖反應，找出嵌入標的基因的轉型株 (transformants)，並挑選其中一個再用液體培養基培養後，以質體純化管柱 (QIAGEN) 將含標的基因的 T-vector 抽出，以待下一步使用。

4. 載體轉入農桿菌中：

將含標的基因的 T-vector，以電穿孔法 (electroporation) 打入農桿菌中，詳細步驟如下：

(1) 製備農桿菌懸浮液

- a. 以 523 medium 振盪培養 *A. tumefaciens* C 58 (約 50 ml) 兩天，至 OD 值達 0.6 左右即可。
- b. 離心 4000g 打入菌體，倒掉培養液。
- c. 以 20 ml 冰水將菌體再懸浮、清洗後，再離心打下。
- d. 共洗三次。
- e. 以 20 ml 冰的 10% Glycerol 洗菌體，再離心打下。
- f. 最後以 0.5 ml 冰的 10% Glycerol 將菌體懸沒浮，並分裝至小試管 (60 ul each)。
- g. 置於 -70°C 保存。

(2) 電孔穿法

- a. 將上述 60 ul 的菌液加入 5 ul 純化的 T-vector 混合。
- b. 置入電穿孔專用之 cuvette，依下列條件進行電穿孔，電阻 200 歐姆，電容 20 u FD，電壓 2.5 KV。
- c. 通電完後，立即加入 1 ml 523 medium (Sucrose 1%, Casein 0.8%, Yeast extract 0.4%, K_2HPO_4 0.2%, MgSO_4 0.02%, pH 7.0)。
- d. 置於 $28^{\circ}\text{C}/2\text{ hr}$ 。
- e. 將菌液塗佈含 Kanamycin 的 523 medium (固體 1.5% agar)。
- f. $28^{\circ}\text{C}/$ 培養兩天。

5. 農桿菌轉型株 (transformants) 之確認：

上述經電穿孔法所得之農桿菌轉型株需進行兩步驟之確認：

(1) T-DNA (含標的基因) 之確認

將菌落做 miniprep preparation 抽出質體，並如前述方法用 PCR 偵測是否帶有標的基因。

(2) 菌落確認

有時其他細菌會夾雜生於其中，故需行 Keto-lactose agar 試驗：

- a. 製備 Keto-Lactose agar (1% Lactose, 0.1% Yeast extract, 1.2% agar)。
- b. 將各菌落以劃線法劃於 Keto-Lactose agar 培養基上。
- c. $28^{\circ}\text{C}/$ 培養二天。
- d. 將 8 ml Benedict's reagent (17.3% Sodium citrate, 10% Na_2CO_3 , 1.73% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)。
- e. 菌周圍有黃色暈圈產生者即為農桿菌 (此特性為農桿菌所特

有)。

6. 藉農桿菌感染植物將標的基因引入植物體中 (在無菌操作環境下進行)：

(1) 植物之準備

將阿拉伯芥種子置於 MS 培養基培養，萌芽後將小芽分株移至新的培養基再培養，以避免過度擁擠產生根系糾纏。

(2) 感染植物

阿拉伯芥小芽(約 1.5cm 高)以攝子輕輕由培養基拉出，置於無菌水中，洗去 agar，將之倒臥在 MS 培養基上，再用新鮮農桿菌液滴在其根部，靜置一天 (28℃/ 避光)。

(3) 去除農桿菌

以抗生素 Timentin (50 ug/ ml)液滴於根部，以殺死農桿菌，並將小芽移到含 hygromycin (50 ug/ml)及 cefotaxime (300 ug/ml) 的 MS 培養基上，兩週後再移至新培養基。

(4) 基因轉移之確認

上述小芽培養一個月後，將根、莖、葉分開收集，各收集 0.3 克後，分別抽取 DNA，再以 BBTv component 1 特異引子對進行 PCR 增幅，結果根莖葉皆有 PCR 增幅片段產生，且根部所得之訊號最強，而未受感染的對照組植物則無任何增幅片段產生，證明轉殖成功。

農桿菌基因轉殖技術已漸趨成熟，目前已有多種基因轉殖作物成功問世。而在香蕉基因轉殖的研究上，亦有數個成功的報告 (Dugdale et al., 1998)，但仍應用在學術理論的研究上；真正用於抗病植物研發而成功者，尚未有完整報告。本研究計劃將能引進最有效而穩定的基因轉殖技術，對最棘手的香蕉萎縮病提供另一條防治之道。

四、國外技術轉移後目前之研究進展

新北蕉品種 218，為目前全世界兼具抗黃葉病與優良園藝特性之最佳「生食蕉」品種，極具蕉果與蕉苗之市場潛力，無論直接種植產果或生產健康種苗，皆有極大發展空間。應用組培技術，可獲得大量不定芽，這些嫩芽即可應用於農桿菌之基因轉殖。目前 DNA polymerase gene 已經由農桿菌轉入新北蕉 218，以 Southern hybridization 篩選後，發現絕大多數皆已經成功插到香蕉基因中。又以 Northern hybridization 測試，發現有 2 株有疑似 Gene Silencing 現象，目前已經將之接種 BBTv 強系統，其抗病性仍在溫室觀察階段。

本研究計劃主持人 (台大植物病理學系名譽教授蘇鴻基) 於 2000 年 8 月已屆齡退休，雖曾獲三次傑出研究獎而符合計劃延提資格，但今年度未再申請。唯蘇教授仍本著熱愛學術之精神，以研究室有限之經費，繼續進行本計劃之後續試

驗，體現學術義工的理想。

參考文獻：

1. Burns, T. M., R. M. Harding and J. L. Dale. 1995. The genome organization of banana bunchy top virus : analysis of six ssDNA components. J Gen Virol 76 : 1471-1482.
2. Dugdale, B., P. R. Beetham, D. K. Becker, R. M. Harding and J. L. Dale. 1998. Promoter activity associated with the intergenic regions of banana bunchy top virus DNA-1 to 6 in transgenic tobacco and banana cells. J Gen Virol 79 : 2301-2311.
3. Okumura, K., L. Chlumsky, T.O. Baldwin and C.I. Kado. 1992. Enhanced stable expression of a vibrio luciferase under the control of the Omega-translational enhancer in transgenic plants. World J. Microbiol. Biotech. 8 : 638-644.
4. Sagi L., B. Panis, S Remy, H. Schoofs, K. De Smet, R. Swennen and B.P. Cammue. 1995. Genetic transformation of banana and plantain (*Musa* spp) via particle bombardment. Biotechnology 13 : 481-485.
5. Su, H. J., L. Y. Tsao and T. H. Hung. 2000. Pathological and molecular characterization of BBTV strains in Asia. Managing banana and citrus disease. pp 79-85. In: Proceeding of a regional workshop on disease management of banana and citrus through the use of disease-free planting materials held in Davao City. Published by Food and Fertilizer Technology Center (FFTC, Taiwan) & International Network for the Improvement of Banana and Plantain (INIBAP, France).
6. Yeh, H. H., Su, H. J. and Y. C. Chao. 1994. Genome characterization of viral-associated dsDNA component of banana bunchy top virus. Virology. 198:645-652.
7. Zyprian, E. and C. I. Kado. 1990. *Agrobacterium*-mediated plant transformation by novel mini-T vectors in conjunction with a high-copy *vir* region helper plasmid. Plant Mol. Biol. 15 : 245-256.

附圖：

1 AGATGTCCCG AGTTAGTGCG CCACGTAAGC GCTGGGGCTT ATTATTACCC CCAGCGCTCG
61 GGACGGGACA TTTGCATCTA TAAATAGACC TCCCCCTCT CCATTACAAG ATCATCATCG
121 ACGACAGAAT GCGCGATAT GTGGTATGCT GGATGTTTAC CATCAACAAT CCCACAACAC
181 TACCAGTGAT GAGGGATGAG ATAAAATATA TGGTATATCA AGTGGAGAGG GGACAGGAGG
241 GTACTCGTCA TGTGCAAGGT TATGTCGAGA TGAAGAGACG AAGCTCTCTG AAGCAGATGA
301 GAGGCTTCTT CCCAGGCGCA CACCTTGAGA AACGAAAGGG AAGCCAAGAA GAAGCGCGGT
361 CATACTGTAT GAAGGAAGAT ACAAGAATCG AAGGTCCCTT CGAGTTTGGT TCATTTAAAT
421 TGTCATGTAA TGATAATTTA TTTGATGTCA TACAGGATAT GCGTGAAACG CACAAAAGGC
481 CTTTGGAGTA TTTATATGAT TGTCCTAACA CCTTCGATAG AAGTAAGGAT ACATTATACA
541 GAGTACAAGC AGAGATGAAT AAAACGAAGG CGATGAATAG CTGGAGAACT TCTTTCAGTG
601 CTTGGACATC AGAGGTGGAG AATATCATGG CGCAGCCATG TCATCGGAGA ATAATTTGGG
661 TCTATGGCCC AAATGGAGGA GAAGGAAAGA CAACGTATGC AAAACATCTA ATGAAGACGA
721 GAAATGCGTT TTATTCTCCA GGAGGAAAAT CATTGGATAT ATGTAGACTG TATAATTACG
781 AGGATATTGT TATATTTGAT ATTCCAAGAT GCAAAGAGGA TTATTTAAAT TATGGGTTAT
841 TAGAGGAATT TAAGAATGGA ATAATTCAAA GCGGGAAATA TGAACCCGTT TTGAAGATAG
901 TAGAATATGT CGAAGTCATT GTAATGGCTA ACTTCCTTCC GAAGGAAGGA ATCTTTTCTG
961 AAGATCGAAT AAAGTTGGTT TCTTGCTGAA CAAGTAATGA CTTTACAGCG CACGCTCCGA
1021 CAAAAGCACA CTATGACAAA AGTACGGGTA TCTGATTGGG TTATCTTAAC GATCTAGGGC
1081 CGTAGGCCCC TGAGCAATGA ACGGCGAGAT C

圖 1. 用於基因轉殖之香蕉萎縮病毒標的基因序列(BBTV component 1, DNA polymerase)