

國立臺灣大學生物資源暨農學院園藝學系

碩士論文

Department of Horticulture

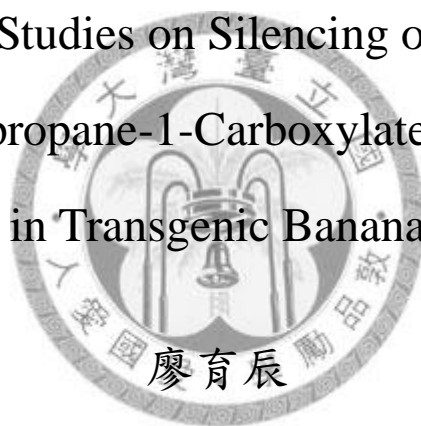
College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

香蕉 ACC 氧化酶基因默化轉殖之研究

Studies on Silencing of
1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Oxidase Genes
in Transgenic Banana



Yu-Chen Liao

指導教授：黃鵬林 博士

杜宜殷 博士

Advisor : Pung-Ling Huang, Dr. Rer. Nat.

Yi-Yin Do, Ph.D.

中華民國九十七年六月

June, 2008

目錄

中文摘要.....	1
Abstract.....	2
壹、前言.....	3
貳、前人研究.....	4
一、 乙烯於植物之生理作用及生合成途徑.....	4
(一) 乙烯於植物之生理作用	4
(二) 乙烯於植物之生合成途徑	4
(三) 植物乙烯的更年性生成表現	5
(四) 香蕉果實後熟的乙烯生合成及相關基因之研究.....	8
二、 ACC 氧化酶之特性與基因之研究	10
(一) ACC 氧化酶之特性	10
(二) ACC 氧化酶基因之選殖與分析	11
(三) 香蕉 (<i>Musa</i> spp., AAA group) ACC 氧化酶基因之選殖與分析	12
(四) 香蕉 ACC 氧化酶之特性與分析	13
三、 乙烯相關基因默化之機制及其應用.....	14
(一) 延緩果實後熟策略.....	14
(二) RNAi 及應用	15
1. 基因默化 (gene silencing).....	15
2. RNAi 之原理	15
3. RNAi 技術之應用	17
4. 應用 RNAi 技術抑制 ACC 氧化酶基因之研究.....	18
參、材料與方法.....	19
一、 香蕉 <i>Mh-ACO1</i> 基因默化轉殖.....	19
(一)植物材料	19
(二)質體材料	19
(三)培養基	19
(四)農桿菌質體 DNA 之小量製備.....	19
(五)農桿菌媒介法轉殖	21
二、 香蕉 <i>Mh-ACO2</i> 基因默化轉殖株分析.....	22
(一)植物材料	22

(二) GUS 活性組織化學染色分析	22
(三)植物基因組 DNA 之抽取.....	23
(四) 植物基因組 RNA 之抽取	23
(五)南方氏雜交分析	24
(六)小片段 RNA 北方雜交分析	25
(七)反轉錄聚合酶連鎖反應	26
(八)香蕉葉片創傷試驗	27
(九)香蕉果實後熟試驗	27
(十)香蕉果實後熟之果皮顏色指數	27
(十一) 香蕉果實呼吸率測定	27
(十二) 香蕉果實乙烯生成量測定	28
肆、結果.....	29
一、 香蕉 <i>Mh-ACO1</i> 基因默化轉殖.....	29
(一) 北蕉懸浮細胞之建立	29
(二) 經農桿菌媒介法轉殖之北蕉細胞抗性篩選.....	29
(三) 農桿菌媒介法轉殖之北蕉細胞生長分化.....	32
二、 香蕉 <i>Mh-ACO2</i> 基因默化轉殖株分析.....	35
(一) GUS 活性組織化學染色分析	35
(二) 南方氏雜交分析	35
(三) <i>Mh-ACO2</i> 默化轉殖北蕉植株生長情形	35
(四) 不同轉殖株系間 <i>Mh-ACO2</i> 基因表現.....	42
(五) siRNA 表現於 <i>Mh-ACO2</i> 基因默化轉殖株.....	42
(六) 香蕉 ACC 氧化酶基因於創傷逆境之表現	42
(七) ACC 氧化酶基因於 <i>Mh-ACO2</i> 默化轉殖株之不同器官表現.....	45
(七) <i>Mh-ACO2</i> 默化轉殖香蕉之果實後熟表現.....	50
1. <i>Mh-ACO2</i> 默化轉殖香蕉之果實自然後熟情形.....	50
2. <i>Mh-ACO2</i> 默化轉殖香蕉之果實催熟情形.....	54
(八) ACC 氧化酶基因於 <i>Mh-ACO2</i> 默化轉殖香蕉果皮與果肉之表現.....	64

伍、討論.....	69
一、香蕉 <i>Mh-ACO1</i> 基因默化轉殖.....	69
(一) 北蕉細胞篩選抗性.....	69
(二) 北蕉細胞的生長分化.....	70
二、香蕉 <i>Mh-ACO2</i> 基因默化轉殖株分析.....	70
(一) 轉殖片段於香蕉基因組中的插入情形.....	70
(二) <i>Mh-ACO2</i> 基因默化轉殖香蕉生長情形.....	71
(三) 不同轉殖株系間 <i>Mh-ACO2</i> 基因默化情形.....	71
(四) siRNA 於轉殖株中之表現情形.....	72
(五) ACC 氧化酶基因於創傷逆境下之表現.....	73
(六) <i>Mh-ACO2</i> 默化轉殖香蕉延緩果實後熟之情形.....	73
(七) ACC 氧化酶基因於果皮與果肉之表現.....	74
陸、結語.....	78
柒、參考文獻.....	79



中文摘要

香蕉 (*Musa spp.*) 為更年性果實，乙烯在果實後熟中扮演重要之角色，而 ACC 氧化酶 (ACC oxidase, ACO) 為乙烯生合成最終步驟酵素。由香蕉中選殖出兩個 ACC 氧化酶基因為 *Mh-ACO1* 及 *Mh-ACO2*。分別將兩個香蕉 ACC 氧化酶基因，利用農桿菌媒介法轉殖以及 RNA 干擾 (RNA interference, RNAi) 技術，默化其在香蕉中的表現，以探討兩基因的功能。建立北蕉懸浮培養細胞系統後，進行農桿菌媒介法轉殖，將默化 *Mh-ACO1* 基因之表現載體轉殖進入北蕉細胞之中，並利用 25 mg/L 的 G418 抗生素進行初期篩選，並在體胚形成後再提高篩選濃度，經過轉殖後的北蕉細胞，於轉殖後 5 個月長出胚根，待發芽後可進行 GUS 活性組織化學染色分析以確認轉殖株。將 *Mh-ACO2* 默化擬轉殖株利用南方氏雜交分析，結果可將擬轉殖系分成三群，並且得知為多拷貝的穩定轉殖。*Mh-ACO2* 默化轉殖株的 *Mh-ACO2* 表現量在各轉殖株系間具有不同程度之默化效果。而在花序的不同器官上，*Mh-ACO2* 及 siRNA 的表現量，也是不盡相同的。創傷逆境的處理下，*Mh-ACO1* 會提高表現，而 *Mh-ACO2* 則否，並且 *Mh-ACO2* 默化的轉殖香蕉，*Mh-ACO1* 表現不會受到影響。*Mh-ACO2* 默化之轉殖香蕉果實，在後熟過程中，其果皮轉色情形、乙烯之生合成與呼吸速率之增加，均有延遲的情形，可同時達到控制果實後熟及延緩果實後熟的產業利用目的。並且推測，在香蕉中果皮及果肉表現上 ACC 氧化酶的表現差異，應主要為 *Mh-ACO2* 所造成，而非 *Mh-ACO1*。*Mh-ACO1* 表現在轉殖株與非轉殖株的果皮與果肉上，具有相同的表現趨勢，而 *Mh-ACO2* 則不同。

Abstract

Banana (*Musa* spp.) is a climacteric fruits. *Mh-ACO1* and *Mh-ACO2* genes isolated from banana (*Musa* spp., AAA group) encode fruit ripening related ACC oxidase (ACO), the last enzyme in the ethylene biosynthetic pathway. *Agrobacterium*-mediated method and RNA interference (RNAi) were used as a strategy of *Mh-ACO1* and *Mh-ACO2* gene inhibition to clarify their function in banana. In the *Agrobacterium*-mediated method, banana (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group) suspension cells were co-cultivated with *Agrobacterium* and selected with 25 mg/L G418. In 5 months, the embryos developed roots. Southern blot analysis indicated that the *Mh-ACO2* silenced transgenic banana lines were divided into three types and the transformed fragments were high copy insertion. The *Mh-ACO2* was decreased in different lines and different organs in transgenic bananas. The siRNAs were only expressed in petal. *Mh-ACO1* was increased in wounded leaves but *Mh-ACO2* was not. When compared with wild type banana, the change of peel color, ethylene production and respiration rate in *MAO2* silenced transgenic banana fruits was delayed. The *Mh-ACO1* and *Mh-ACO2* gene expression pattern in peel and pulp were different.

壹、前言

香蕉為更年性果實，其乙烯生理作用包括兩系統假說：系統 I 負責植物營養生長期間及果實後熟前期之少量乙烯合成；系統 II 則受到系統 I 生成的乙烯作用，開始大量產生乙烯，進而引發果實後熟作用。ACC 氧化酶為乙烯合成最終步驟酵素，期望藉由默化 ACC 氧化酶基因，釐清其在香蕉生長及更年性果實後熟上扮演之角色。

本篇論文將建立可供農桿菌媒介法轉殖用之北蕉懸浮細胞，並利用默化 *Mh-ACO1* 表現質體 pBI121-1AnS (林, 2004) 進行轉殖試驗，期望取得默化 *Mh-ACO1* 的北蕉轉植株，供日後分析之用。另外，針對轉殖默化 *Mh-ACO2* 表現質體 pBI121-2AnS 的北蕉轉植株 (林, 2004; 李, 2006) 進行分析試驗，分析其在不同轉植株系以及不同器官組織間，RNAi 抑制 *Mh-ACO2* 的表現情形；觀察 siRNA 的生成表現以了解 RNAi 的作用效果；默化 *Mh-ACO2* 基因後對果實的後熟影響，測量後熟果實的乙烯的合成及呼吸作用表現；並觀察 *Mh-ACO2* 基因默化後，對屬於同 ACC 氧化酶基因家族的 *Mh-ACO1* 基因表現之影響；觀察香蕉轉殖植株的生長情形、創傷後的表現等，以了解默化 *Mh-ACO2* 後對香蕉的生理影響。

期望經由這些試驗與分析，進一步釐清 *Mh-ACO1* 與 *Mh-ACO2* 基因在香蕉中的作用情形，以期了解兩基因在乙烯生成系統中所扮演的角色，最終期望能取得可有效延緩及可經由人為調節果實後熟的香蕉，以供日後產業應用。

貳、前人研究

一、乙烯於植物之生理作用及生合成途徑

(一) 乙烯於植物之生理作用

乙烯為一簡單之碳氫化合物，其化學式為 C_2H_4 ，在植物體中以氣體的形式存在，是一個植物的代謝產物，僅需少量 (0.01-0.1 ppm) 即可影響許多的植物生理反應 (Burg, 1962)，且可與其他荷爾蒙發生交感或拮抗作用，並且非以基質或輔助因子的方式引起生理反應，因此乙烯被認定是一種植物荷爾蒙 (Lieberman, 1979)。

乙烯為廣泛性的植物荷爾蒙，幾乎在植物整個生活史中皆有參與，對於植物生長發育及生理作用，如促進休眠性種子的發芽 (Egley and Dale, 1970)、促進不定根之形成 (Zimmerman and Dale, 1970)、葉柄的上偏性生長 (Abeles, 1973)、白化幼苗的芽鉤緊閉 (Neljubov, 1993)、促使鳳梨類植物開花 (Abeles, 1973)、誘導瓜類雌花之形成 (Rudich et al., 1972)、增進某些植物抗病之能力 (Abeles, 1973)、更年性果實後熟、葉及花朵的老化、離層的產生等 (Yang and Hoffman, 1984)，或對於外在逆境的刺激反應，如物理性傷害、病原菌入侵、淹水等皆有所調控 (Yang and Hoffman, 1984; Bleeker, 2001; Johnson and Ecker, 1998; O'Neill et al., 1993; Wang et al., 2002)。

(二) 乙烯於植物之生合成途徑

在高等植物之中，乙烯生合成的第一步，為甲硫胺酸 (methionine) 經由 SAM 合成酶 (S-adenosyl-L-methionine synthetase) 催化產生 SAM (S-adenosyl-L-methionine)。然後 SAM 再經由 ACC 合成酶 (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase, ACS) 催化產生主要產物 ACC 和次要產物 MTA (methylthioradenosine)。最後，ACC 經由 ACC 氧化酶 (ACC oxidase, ACO) 催化轉變成乙烯。少部分 ACC 會轉變成 MACC

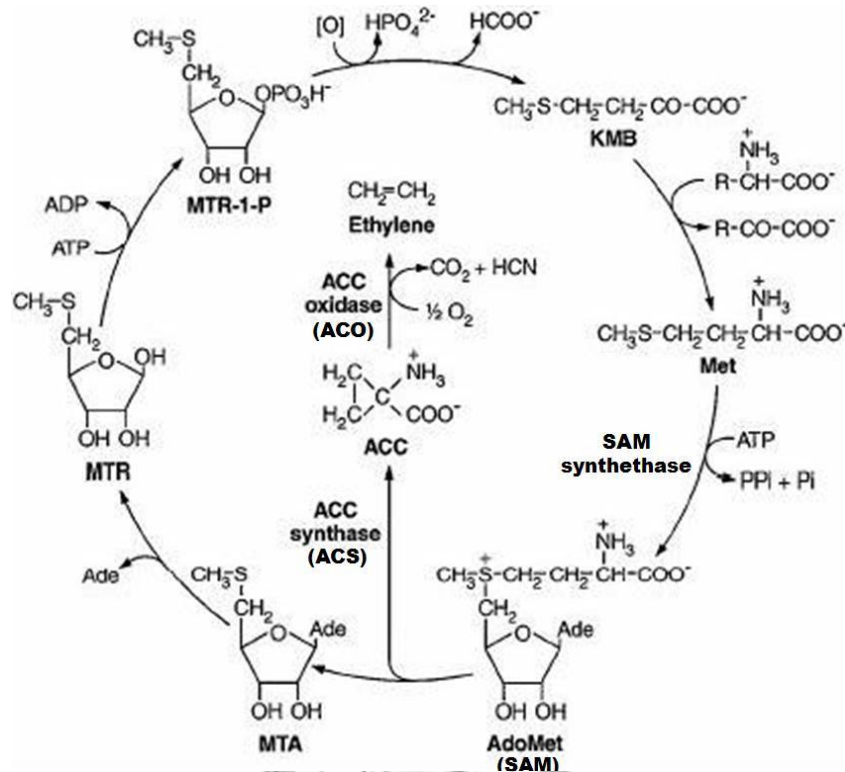
(N-malonyl ACC) 貯存在植物體內，而 MTA 會經由另一個循環，重新轉變成甲硫胺酸 (Yang and Hoffman, 1984) (圖一)。

植物中負責乙烯合成的酵素有三種：SAM 合成酶、ACC 合成酶、ACC 氧化酶，而其中主要影響乙烯生合成表現量的，主要為 ACC 合成酶與 ACC 氧化酶，SAM 合成酶表現較為穩定，對乙烯生合成影響較小 (Picton, et al., 1995)。

(三) 植物乙烯的更年性生成表現

在果實後熟過程中的呼吸作用，會呈現兩階段的增加，在後熟前期，呼吸作用產生出的二氧化碳，為穩定的生成，當果實進入後熟階段，呼吸作用會急速的上升，二氧化碳大量的增加，此情形稱為更年性上升 (climacteric rise)，而具有此現象的水果，稱之為更年性果實 (climacteric fruit; Kidd and West, 1930)，如酪梨、芒果及香蕉等 (Burg and Burg, 1965)；而無此現象之水果則稱為非更年性果實 (nonclimacteric fruit; Biale, 1960)。更年性果實成熟過程中，除了呼吸作用有此兩階段的上升表現，乙烯的生合成也有類似的情形 (McMurchie, 1972)。

McMurchie 等 (1972) 以丙烯 (propylene) 處理香蕉果實後，成功的誘導出典型更年性呼吸作用反應，並且有大量的內生乙烯產生，另外並針對非更年性的檸檬果實，同樣施用丙烯處理，雖然同樣可提高呼吸作用，但是並不能增加乙烯的產生。因此，McMurchie 等 (1972) 提出植物體內有兩套乙烯生合成系統的假說，認為植物生長發育過程中，會產生供一般生理應用的微量乙烯，這時的乙烯生合成系統稱為系統一，就果實而言，非更年性果實或在後熟前期的更年性果實，所產生的乙烯，均歸於此一系統。而更年性果實在進入後熟時期後，大量的乙烯生成表現，則是由另一個系統所負責，稱為乙烯生合成系統二，系統二可以藉由果實自然後熟所產生的內生乙烯所啟動，也可以被外源乙烯所誘導。當更年性果實



圖一、高等植物乙烯合成途徑

Fig. 1. The ethylene biosynthetic pathway of high plants.

ACC, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid; AdoMet (SAM), S-adenosylmethionine; KMB, 2-keto-4-methylthiobutyrate; Met, methionine; MTA, 5'-methylthio-adenosine; MTR, 5'-methylthioribose; MTR-1-P, 5'-methylthioribose-1-phosphate. (Modified from Yang and Holffman, 1984; Bleecker and Kende, 2000)

中，系統一所產生的內生乙烯累積到一定的量，便會催化系統二的作用，產生大量的乙烯，同時造成呼吸作用的加速及果實後熟生理的變化。系統二所引發的催化乙烯產生作用一旦開始，即會自動的催化下去，產生大量的內生乙烯。非更年性果實的乙烯生合成只有系統一，沒有系統二，如果將外源的乙烯去除，則後熟反應就會停止 (McMurchie et al., 1972)。Yang 和 Hoffman (1984) 及 Bufler (1984) 指出，系統二的反應是透過 ACC 合成酶和 ACC 氧化酶催化所致，當系統一生成的乙烯或外源乙烯的量達到一定程度，便會活化這兩個酵素的活性。

植物非果實的其他部位，在老化或外在因子的作用下，乙烯的產生也有類似於更年性的上升情形 (Aharoni et al., 1979; Gepstein and Thimann, 1981; Riov and Yang, 1982; Morgan et al., 1992; Katz et al., 2005)。Riov 及 Yang (1982) 利用柑橘的葉片，進行乙烯的催化處理，觀察到乙烯的產生有類似更年性上升的表現，如果持續的外施乙烯處理，會自動誘發內生乙烯的產生；如果去除，則會快速的減少。然而，亦有相異的情形，如菸草的在葉片衰老最初之時，乙烯的生成量會下降，進入衰老前期才會明顯上升，並且在進入後期後，乙烯生合成的表現下降 (Aharoni et al., 1979)。Katz 等 (2005)，利用柑橘成熟葉與幼葉，進行外施乙烯及創傷處理，結果顯示乙烯的產生包含兩種生成系統的表現，在前期，乙烯低量的表現，為系統一的時期，而後期會進入之後的系統二，出現更年性的乙烯上升現象。而在兩個系統之中，主要控制乙烯生合成的相關基因亦不同，如系統一可觀察到 *CsACS2*、*CsERS1* 及 *CsETR1* 等基因穩定表現 *CsACO1* 則不表現，而當進入系統二後，隨著乙烯的大量生成，會促進 *CsACS1* 及 *CsACO1* 的表現，此結果顯示在葉片中的乙烯生合成系統一及二，主要調控乙烯生合成量變化為不同的基因 (Katz et al., 2005)。

(四) 香蕉果實後熟的乙烯生合成及相關基因之研究

香蕉為芭蕉科 (*Musaceae*) 芭蕉屬 (*Musa*) 原產於亞洲熱帶之大型單子葉植物，屬於典型之更年性水果，其乙烯的生合成作用，也符合更年性的系統一及系統二之兩系統假說 (Burg and Burg, 1965)。

Liu 等 (1999) 研究中顯示，香蕉 (*Musa* 'Cavendish subgroup', AAA group) 果實中，*MA-ACSI* 基因所轉譯出的 ACC 合成酶，調控自然後熟過程中乙烯生合成更年性反應的起始階段，導致大量生成乙烯。在乙烯生成達到高峰時，同時伴隨著 *MA-ACSI* 表現的增加，而之後立刻減少，另外，*MA-ACOI* 的表現量則隨著後熟過程有漸漸累積的趨勢，並在後期表現漸緩。此外，在後熟之初，ACC 氧化酶的活性會大量提高，之後則快速減少。如對香蕉果實施加 $100 \mu\text{L L}^{-1}$ 乙烯處理 18 小時後，於 22°C 下觀察，結果顯示 *MA-ACOI* 在第 0 至 1 天即開始表現，而之後則持續多量的累積，ACC 氧化酶酵素活性則在第 1 天呈現表現高峰，第 1 天後則急劇下降，至第 6 天為止呈現微量表現，而 *MA-ACSI* 則到第 1 天才具明顯表現。此外，乙烯及 ACC 的生成量，由零至二天呈現線性的上升，至第 6 天為止呈現穩定表現 (Liu et al., 1999)。

ACC 氧化酶的作用需要抗壞血酸 (ascorbate) 及鐵等輔助因子 (cofactors) 共同作用 (Ververidis and John, 1991)。Liu 等 (1999) 針對香蕉後熟果實進行外施乙烯處理，觀察自由態抗壞血酸 (free ascorbate) 及可溶性鐵 (soluble iron) 的含量。結果顯示，抗壞血酸與鐵在後熟開始時期都會增加，之後逐漸下降至完熟期 (full-ripe stage)。其中，鐵的下降趨勢相對於抗壞血酸來說較為快速。如果外施抗壞血酸與鐵這些輔助因子，結果顯示 *in vivo* 的 ACC 氧化酶活性，會被持續提高 (Liu et al., 1999)。

Huang 等 (2006) 利用發表的番茄 (Van Der Straeten et al., 1990)、夏南瓜 (Nakajima et al., 1990) 及蘋果 (Dong et al., 1991) 等 ACC 合成酶蛋

白質演化保留區域，設計兩段寡核苷酸引子 (primer) ACS-1 及 ACS-2，並以香蕉基因組 DNA 為模板，進行聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)，再將合成出之基因片段製作成探針。利用此探針進行香蕉 (*Musa* spp., “Hsien Jin Chiao”, AAA group) 果實 cDNA 庫的篩選，得到 ACC 合成酶的 cDNA 選殖系。由分析結果顯示，香蕉中 ACC 合成酶基因為多基因家族，具有九個 ACC 合成酶基因，分別為 *MACS1* 到 *MACS9*，且在後熟果實以及乙烯處理後的觀察下，得知九個 ACC 合成酶基因表現並不相同。其中 *MACS1* 會在後熟果實中表現，並且也會受到外施乙烯的誘導。*MACS1* 在不同果實成熟度 (依果皮顏色分一至六級) 下，表現量以成熟度第五級為最多，第一級時則未見表現；而其他 ACC 合成酶基因則在果實後熟過程中，未見明顯表現。此外，在外施乙烯處理果實的試驗中顯示，處理 10 ppm 乙烯，即可誘導 *MACS1* 基因開始表現 (Huang et al., 2006)。

Inaba 等(2007) 分別針對香蕉 (*Musa* spp., “Cavendish subgroup”, AAA group) 果實的果皮及果肉組織，進行丙烯及 1-甲基環丙烯 (1-methylcyclopropene, 1-MCP) 組合的處理試驗，結果顯示在果皮與果肉中，乙烯的生合成表現是相異的。預先將果實處理 500 ppm 丙烯 18 小時之後，再處理 1-MCP 之結果顯示，在果肉中，乙烯的生成量增加，並且 ACC 合成酶的活性與 ACC 的含量也會提高，而 *MA-ACS1* 基因的表現則是會降低，而 *MA-ACO1* 基因持續大量的穩定表現。而在果皮中，處理後的乙烯生成量也會增加，但果皮中的 *MA-ACS1* 及 *MA-ACO1* 基因的表現則都隨著成熟度的增加而增加，ACC 合成酶與 ACC 氧化酶的活性升高。顯示在後熟的香蕉果實中，對於乙烯生合成作用，果肉的部分屬於負向調控，而果皮中則是正向的調控 (Inaba et al., 2007)。

二、ACC 氧化酶之特性與基因之研究

(一) ACC 氧化酶之特性

ACC 氧化酶最初被命名為乙烯形成酶 (ethylene-forming enzyme) (Yang and Hoffman, 1984)，研究初期，許多學者利用酵素化學的方法，一直都無法分離純化出具功能性之蛋白，直至 Ververidis 與 John (1991) 在含鐵 (Fe^{2+}) 及抗壞血酸 *in vitro* 的情況下，得到具活性之蛋白質，間接證實鐵及抗壞血酸為 ACC 氧化酶活性所需因子，另 Kao 及 Yang (1982) 研究得知二氧化碳為輔助因子，最後建立 ACC 到乙烯的反應式為 (Dong et al., 1992)：



ACC 氧化酶的作用具有立體特異性 (stereospecificity)，即活化部位與基質有一定的鍵結方向 (Hoffman et al., 1982)。依據酵素特性分類，ACC 氧化酶屬於 non-heme iron (II) dependent oxygenase/oxidase 酵素。比較 ACC 氧化酶和同樣屬於此類酵素的 isopenicillin N synthase (IPNS) 與 2-oxoglutarate Fe^{2+} dependent dioxygenase 序列，顯示三者中皆有一個天門冬胺酸 (aspartate, Asp) 及 ACC 氧化酶上具保守性之六個組胺酸 (histidine, His) 中的兩個，在序列上具保守相似性，這三個胺基酸位置可能為 Fe^{2+} 的結合位置 (Zhang et al., 1997)。

當植物組織中膜系遭到破壞時，ACC 氧化酶活性將會喪失，導致乙烯生成受到抑制，因此認為 ACC 氧化酶與膜系的完整有關 (Imaseki and Watanabe, 1978; Yang and Hoffman, 1984)。番茄 ACC 氧化酶的胺基酸序列具有兩極性的 α 螺旋 (α -helix) 形成之潛力，並在疏水性端含有許多的白胺酸 (leucine, Leu)，而在已知的 ACC 氧化酶中亦觀察到大多具有白胺酸拉鍊結構 (leucine zipper) 形成之潛力區，因此推測 ACC 氧化酶可能為鑲

嵌於膜上之蛋白 (Kende, 1993)。

利用 ACC 處理非更年性植物，同樣可以觀察到乙烯的產生，顯示 ACC 氧化酶為持續穩定表現之酵素，因此推測 ACC 合成酶才是乙烯生合成速率決定步驟的作用酵素 (Yang and Hoffman, 1984)。ACC 氧化酶的活性，對於乙烯的濃度極為敏感，並且會受到許多的因子所誘發，因此在許多的生理反應之中，被認為是關鍵的作用酵素。如康乃馨外施乙烯及授粉處理後，結果顯示 ACC 氧化酶基因表現及酵素活性，皆與乙烯的生合成表現一致 (Woodson et al., 1992)。另外如蘋果 (Dong et al., 1992)、酪梨 (Sitrit et al., 1986)、洋香瓜 (Ververidis and John, 1991) 等，均可觀察到在乙烯生合成的相關試驗之中，ACC 氧化酶的活性亦明顯的提高，顯示出乙烯的生成需要 ACC 氧化酶的配合。

(二) ACC 氧化酶基因之選殖與分析

植物 ACC 氧化酶基因之選殖，最早是由番茄中進行，Grierson 等 (1985) 從後熟番茄果實之 mRNA 轉譯所得數種蛋白質，除了 polygalacturonase，其他功能未知，其中一個蛋白的分子量為 35 kDa，其解碼的 cDNA 命名為 pTOM13 (Slater et al., 1985)，之後 Hamilton 等 (1991) 將 pTOM13 cDNA 轉殖進入酵母菌表現，成功表達酵素活性使 ACC 轉變為乙烯。Spanu 等 (1991) 將與 pTOM13 同源的 pHTOM5 轉殖到蠨螋的卵母細胞 (*Xenopus laevis* oocytes)，成功將 ACC 轉化成乙烯。以上結果證實 pTOM13 所解碼出的蛋白質即為 ACC 氧化酶。

植物 ACC 氧化酶基因為多基因家族 (multiple gene family)，會於不同植株部位、發育階段 (Do et al., 2005)，因應外界不同的訊息 (Barry et al., 1996) 而產生差異性的表現，且不同植物的 ACC 氧化酶基因，甚至同一植物不同基因家族成員間核酸或胺基酸序列同源性差異甚大 (Do et al., 2005; Hudgins et al., 2006)。以番茄為例，其具三個 ACC 氧化酶基因：

LE-ACO1、*LE-ACO2* 和 *LE-ACO3*，於花器形成時，*LE-ACO1* 基因會表現在花瓣、柱頭及花柱，*LE-ACO2* 於花藥表現，而 *LE-ACO3* 基因則除了萼片外，會在所有花器中表現 (Barry et al., 1996)。

(三) 香蕉 (*Musa spp.*, AAA group) ACC 氧化酶基因之選殖與分析

香蕉的 ACC 氧化酶基因是從後熟果實 cDNA 庫篩選得到，共分離出兩個 ACC 氧化酶基因 *Mh-ACO1* (Do et al., 2005) 和 *Mh-ACO2* (Huang et al., 1997)。比較二者基因結構顯示，*Mh-ACO1* 基因具兩個方向相對的重複序列，兩者均具有三個外顯子 (exons) 與兩個隱子 (introns)，而 *Mh-ACO2* 則具有四個外顯子與三個隱子 (Huang et al., 1997; Do et al., 2005)。

比較香蕉與其他不同植物，如蘋果、甜瓜、木瓜、桃與番茄等之 ACC 氧化酶基因結構，結果顯示，其均具有二至三個隱子，其中香蕉之 *Mh-ACO1* 與甜瓜 *Cm-ACO2* 同樣具兩個位置相同的隱子，而甜瓜 *Cm-ACO3* 也具兩個內隱子，但存在位置不盡相同，另其他的 ACC 氧化酶基因，包括香蕉 *Mh-ACO2*、甜瓜 *Cm-ACO1*、木瓜 *Cp-ACO1*、桃 *Pp-ACO1*、番茄 *Le-ACO1-3*、蘋果 *Md-ACO1-3* 均具有三個位置相似的隱子 (Do et al., 2005)。

Mh-ACO1 據推測在香蕉中為多拷貝基因，而 *Mh-ACO2* 為單一拷貝基因。於表達部位之研究中顯示，*Mh-ACO1* 在根、苞片、花瓣、雄蕊、雌蕊、後熟果實中皆有 mRNA 累積，尤其在雄蕊、苞片、後熟果實；而 *Mh-ACO2* 只有在後熟果實中有大量表現，造成 mRNA 的累積。在不同後熟時期果皮與果肉 mRNA 表現上，*Mh-ACO1* 只有少量的表現，而 *Mh-ACO2* 則隨著成熟度增加而累積大量 mRNA，且觀察到只要有微量之乙烯即可誘導 *Mh-ACO2* 表現，因此推測 *Mh-ACO2* 與催化香蕉果實後熟反應的啟動相關 (張, 1994)。

觀察 ACC 氧化酶基因於香蕉果實中不同成熟期 (依果皮轉色情形分一至七期) 的表現，結果顯示在果皮中，*Mh-ACO1* 與 *Mh-ACO2* 均有表現，

以成熟期第五期表現量最多，而整體而言，*Mh-ACO2* 又略多於 *Mh-ACO1*，在果肉中，*Mh-ACO1* 除了在第一期未見明顯表現外，在各期均呈現少量且恆定的表現，而 *Mh-ACO2* 相較於 *Mh-ACO1* 表現量則較多，其中以第三至四期表現量為最多 (Do et al., 2005)。

利用轉殖阿拉伯芥分析 *Mh-ACO1* 及 *Mh-ACO2* 兩基因之啟動子表現。以 GUS 活性組織化學染色法，觀察於不同植株部位及不同處理下，啟動子的作用情形，結果顯示，*Mh-ACO1* 啟動子於莖葉、苞片、花絲、花藥、柱頭、長角果與離層均有表現 GUS 活性，其表現隨著阿拉伯芥之生長發育階段不同而異；而 *Mh-ACO2* 啟動子於任何生長發育階段均不表現。而誘導試驗結果顯示，IAA、NAA、BA、GA3、ABA、JA、SA、NaCl、乙烯、光、淹水、低溫、機械傷害與乾旱等，均可誘導 *Mh-ACO1* 啟動子之表現，而 *Mh-ACO2* 啟動子僅於 JA 及乙烯處理可誘導其果莢表現，此結果指出 *Mh-ACO1* 及 *Mh-ACO2* 兩基因之啟動子表現具有組織位置表現的專一性 (李, 2006)。

(四) 香蕉 ACC 氧化酶之特性與分析

賴 (1997) 利用大腸桿菌 (*E. coli*) 分別表現香蕉 ACC 氧化酶蛋白 *Mh-ACO1* 及 *Mh-ACO2*，以分析其生化特性，觀察兩 ACC 氧化酶對基質 ACC 之 K_m 值，其中 *Mh-ACO1* 之 K_m 值為 65.8 mM，*Mh-ACO2* 為 38.2 mM，此結果表示出 *Mh-ACO2* 對 ACC 的親和力大於 *Mh-ACO1*。另外，比較兩蛋白對 NaHCO_3 的 K_m 值，可發現 *Mh-ACO2* 較 *Mh-ACO1* 大四倍，此結果反應出香蕉果實後熟前後期的二氧化碳生成量，與兩個酵素的作用時期有關，低成熟度果實初期的呼吸率約為 30 至 45 $\text{mg}/\text{CO}_2/\text{kg}/\text{hr}$ ，經過 1000 ppm 的乙烯處理後，會有呼吸高峰的產生，二氧化碳的產生量可達到 140 $\text{mg}/\text{CO}_2/\text{kg}/\text{hr}$ ，呼吸高峰約為前期的四倍，此結果與兩酵素對 NaHCO_3 的 K_m 值差異相似。由以上結果推測，果實前期低量的二氧化碳，

可供給 Mh-ACO1 催化生成系統一時期的乙烯，當達到呼吸高峰時，高量二氧化碳供給 Mh-ACO2 催化系統二的乙烯生成 (賴, 1997)。

分析香蕉後熟過程中 Mh-ACO1 與 Mh-ACO2 蛋白的表現，顯示 Mh-ACO1 在植株中表現低量且穩定，而 Mh-ACO2 蛋白則在果實後熟的過程中大量表現 (劉, 1995)。經由免疫組織定位技術，觀察到 Mh-ACO1 在後熟果實中表現量少，但呈現持續且穩定的表現，而 Mh-ACO2 量會隨著成熟度增加而增加，且果肉之部分大於果皮，此結果類似更年性果實乙烯生成系統一之特性，乙烯量少但穩定產生，待進入系統二時才開始大量產生乙烯 (周, 1996)。因而推測 Mh-ACO1 可能在植株平常生理與果實前期表現，而 Mh-ACO2 則在果實後期作用，促使香蕉果實後熟 (賴, 1997)。

三、乙烯相關基因默化之機制及其應用

(一) 延緩果實後熟策略

為了要延緩更年性果實的後熟，一般所採用的是利用低溫儲藏、使用乙烯吸收劑、施用乙烯生成抑制劑，如胺基乙氧基乙烯甘胺酸 (aminoethoxyvinyl glycine, AVG)、胺氧乙酸 (aminioxyacetic acid, AOA) 等 (Yu et al., 1979)，或乙烯作用抑制劑，如 norbornadiene (NBD) (Lincoln et al., 1987)、銀離子 (Saltveit et al., 1978; Hobson et al., 1984; Davis et al., 1988)、1-MCP 等方法。

利用生物技術及基因轉殖的方式，抑制乙烯生合成的相關基因或蛋白，也可以達到降低乙烯表現的效果，進而達到延緩果實後熟之目的。Oeller 等 (1991) 將 ACC 合成酶反義股基因，轉殖進入番茄之中，結果顯示，轉殖番茄的乙烯生成量降低了 99%，並延緩了果實的後熟轉色。Ayub 等 (1996) 轉殖 ACC 氧化酶反義股基因進入甜瓜之中，結果顯示，乙烯的生成量降低了約 99%。Klee 等 (1991) 由 *Pseudomonas* sp. 之中，選殖出

ACC 去胺酶 (ACC deaminase) 基因，ACC 去胺酶可以將 ACC 代謝成為 α -ketobutyrate，將此基因轉殖進入番茄之中過量表達，可降低約 90 至 97% 的乙烯生成量。

(二) RNAi 及應用

1. 基因默化 (gene silencing)

基因默化是指功能性完整的基因在生物體中，受到其他因素影響而無法表現，為一種在動物及植物中可廣泛觀察到的生理機制。基因默化的起因分為兩種，若是因為基因的 mRNA 被分解所造成，因為發生在轉錄之後，故亦可稱為轉錄後基因默化 (Post-transcriptional gene silencing, PTGS)；而如果是 DNA 被甲基化或轉錄過程中被終止，則稱為轉錄時基因默化 (Transcriptional gene silencing, TGS)。基因默化現象對植物來說是一種防禦外來核酸入侵的機制，轉錄時基因默化造成 DNA 片段甲基化，防止外來的跳躍因子進入基因組中，而轉錄後基因默化則是避免病毒遺傳物質侵入，防止病毒在細胞質中複製造成感染 (Vance et al., 2001; Waterhouse et al., 2001)。

2. RNAi 之原理

Fire 等 (1998) 首先證實將與線蟲相關基因的雙股 RNA (double-strand RNA, dsRNA) 送入線蟲體內，可產生具有專一性且可遺傳至後代的基因默化，並將此現象稱之為 RNAi。RNAi 是屬於轉錄後基因默化的基因默化，其是利用雙股 RNA 造成 mRNA 降解之機制，達到基因默化之效果。雙股 RNA 會被一種稱為 Dicer 的 RNase III 核酸內切酶所辨識 (Duxbury et al., 2004)，因而將雙股 RNA 切割出 3' 端具有兩個核苷酸突出之 21 至 25 片段大小的小片段 RNA 分子，即為 small interfering RNA (siRNA) (Bernstein et al., 2001)，siRNAs 又會與蛋白質形成複合體 RNA-induced silencing complex (RISC)，RISC 會連結目標 mRNAs 並降解

之，進而達到默化目標基因之表現 (Matzke et al., 2001; Waterhouse et al., 2001)。

在阿拉伯芥之中的 Dicer 稱之為 DCL (Dicer-like)，目前發現有四種 DCL 蛋白，分別為 DCL1、DCL2、DCL3 及 DCL4，並各自具有不同的功能，產生不同的小片段 RNA (small RNAs)。目前已知，DCL1 會負責產生十四種以上的 microRNAs (Park et al., 2002)，而 *DCL1* 基因會表現在頂端分生組織 (apical meristems)、花芽分生組織 (floral meristem)、花部器官、莖生葉 (cauline leaf) 及莖 (Jacobsen et al., 1999)。DCL2 的功能，則是參與植物對抗特定病毒的 RNA 默化防禦反應 (Borsani et al., 2005)。而 *DCL2* 基因會在花序 (inflorescence) 上表現，但在葉片中則無 (Meins et al., 2005)。DCL3 會產生 24nt 大小的 siRNA，另外也與 DNA 的甲基化及異染色質 (heterochromatin) 的形成有關 (Xie et al., 2004)。而 *DCL3* 基因與 *DCL2* 基因相似，都會在花序上表現，而在葉片中則未見 (Meins et al., 2005)。而 DCL4 則會協助產生 *trans*-acting siRNA 以及 siRNA 在於 RNA 默化反應上的作用 (Dunoyer et al., 2005; Kobayashi and Zambryski, 2007)。

RNAi 的效率很高，只要少量雙股 RNA 就可達到抑制目標基因活化的效果。Nishikura (2001) 指出，RNAi 機制如同 PCR，當 siRNAs 的量到達一定濃度之後，小片段的 siRNAs 可與目標基因之 mRNA 進行互補性接合，作為引子再經由 RNA dependent RNA polymerase (RdRP) 的作用，合成雙股的 RNA，而此 RNA 又被 Dicer 切成小片段的 siRNAs，如此以達到默化目標 mRNAs 的功能。由上述 RNAi 的作用過程，可知外源性雙股 RNA 被 Dicer 分解形成初級 siRNAs，再透過 RdRP、Dicer 的作用形成更多之初級及次級 siRNAs。初級 siRNAs 和次級 siRNAs 可以繼續對其與其相似序列的 mRNA 進行 RNAi 作用；分別稱為 primary RNAi 和 transitive RNAi，因此 transitive RNAi 會表現出原始 primary RNAi 目標序

列周圍區域的默化結果，而在植物中 transitive RNA silencing 的相關機制研究並未透徹 (Nishikura, 2001)。

siRNA 在 RNAi 作用機制中，可分為兩大類，第一類為 21 至 22 nt 大小的短片段 siRNA，主要參與 mRNA 的降解作用，但不會有系統性的移動；另一類是大小 24 至 27 nt 的長片段 siRNA，在阿拉伯芥之中，主要為 DCL4 這類 Dicer 所產生，其會參與系統性的移動，並且與 DNA 的甲基化有關(Hamilton et al., 2002; Dunoyer et al., 2005)。

3. RNAi 技術之應用

RNAi 技術目前被廣泛應用在疾病預防與基因功能分析的方面上，基因默化的能力可經由有性繁殖遺傳至下代 (Fire et al., 1998)，並且具有移動性，可從一細胞轉移到其他細胞中 (Waterhouse et al., 2001; Dunoyer et al., 2005)。

目前於植物中，為了引發 RNAi 機制，最常使用的多為雙股 RNA 型式的構築，並將其設計成能產生莖與環 (stem and loop) 之結構，具有雙股之莖序列為默化之目標基因的部份序列，單股構造之環 (spacer) 序列為隱子 (intron) 序列，並利用強且持續表現之基因啟動子進行轉錄作用，此種基因結構引起的 RNAi 效果為最佳 (Wesley et al., 2001)。

植物病毒之基因組可為單股或雙股 RNA，而其中有九成的植物病毒是單股的 RNA，當病毒單股 RNA 進入植物細胞時，細胞內的 RdRP 即可依病毒 RNA 為模板合成雙股 RNA，進而造成 RNAi 之機制，而降解掉病毒的 RNA，達到抗病之效果，此現象稱為 Virus-induced gene silencing (VIGS) (Lindbo et al., 1993; Kumagai et al., 1995)。

RNAi 技術大略可分為以下幾個環節：(1) 確定目標基因；(2) 設計 RNAi 序列；(3) RNAi 表達載體的構築；(4) RNAi 表達載體的轉殖；(5) RNAi 作用效果的檢測 (Wu and Hou, 2006)。

4. 應用 RNAi 技術抑制 ACC 氧化酶基因之研究

(1) 番茄

Xiong 等 (2005) 構築含番茄 ACC 氧化酶基因片段之雙股 RNA，將其轉殖進入番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill) 之中，所得的轉殖株依照對 ACC 氧化酶基因的默化效果，以及 siRNA 表現情況，可將轉殖株分為 full-RNAi、semi-RNAi 及 non-RNAi 三類，其中 full-RNAi 的轉殖株，佔所有轉殖株系中的 9.6%，semi-RNAi 佔 18.1%，而 non-RNAi 佔了 72.3%。觀察顯色期 (breaker) 開始後第三天的 full-RNAi 轉殖番茄果實，其乙烯的生合成降低了約 99%，並且果實的後熟轉色，延遲了超過 120 天。另外在葉片的創傷試驗中，也顯示出在創傷處理兩天後，full-RNAi 轉殖番茄的葉片乙烯產生量降低約 99.5% (Xiong et al., 2005)。

(2) 香蕉

林 (2004) 利用香蕉 ACC 氧化酶基因 *Mh-ACO1* 第一個隱子作為 RNAi 構築結構中的 spacer，以 CaMV 2X 35S 當作啟動子構築 RNAi 基因默化之通用載體 pRNAi，並比對香蕉 *Mh-ACO1* 及 *Mh-ACO2* 之 cDNA 核苷酸序列，利用兩序列間相似度最低的區域，構築於 pRNAi 載體，分別為順、反向及反、順向結構。構築之載體經轉殖至農桿菌品系 LBA4404 並進行北蕉 (*Musa* spp. cv. Pei-Chiao, AAA group) 懸浮細胞之轉殖 (林, 2004)，得到默化 *Mh-ACO2* 之香蕉擬轉殖植株，經 GUS 活性組織化學染色與南方氏雜交分析，確認轉殖株 (李, 2006)。

參、材料與方法

一、香蕉 *Mh-ACO1* 基因默化轉殖

(一) 植物材料

香蕉北蕉品種 (*Musa* spp. cv. Pei Chiao, AAA group) 所誘導之癒合組織及其懸浮培養細胞，癒合組織培養於固態 YCP 培養基，之後將癒合組織轉移進入液態 YCP 或 TB5 培養基以 25°C、120 rpm 震盪培養，以誘導並培養懸浮細胞。

(二) 質體材料

使用 pBI121-1AnS 質體 (林, 2004)，將其轉型進入農桿菌品系 LBA4404 之中，以供轉殖之用。

(三) 培養基

1. 香蕉植物培養基

本試驗所進行香蕉癒合組織培養為 YCP 培養基，懸浮細胞培養為 YCP 或 TB5 培養基，共培養與體胚誘發為 SH 培養基 (Schenk and Hildebrandt, 1971)，組織分化後之材料培養於 1/2 BG 培養基。TB5、YCP 與 BG 培養基成分如表一所示。

2. 農桿菌培養用

農桿菌培養於 YEB 培養基，其配方為 5 g/L Beef extract，1 g/L Yeast extract，5 g/L Peptone，5 g/L Mannitol，0.5 g/L MgSO₄，pH 7.4。

(四) 農桿菌質體 DNA 之小量製備

將農桿菌培養於含相對應抗生素之固態 YEB，於 28°C 培養兩天，挑選單一菌落接種於含相對應抗生素之 50 mL 液態 YEB 培養基中，於 28°C 以 240 rpm 震盪培養兩天，待 O.D.₆₀₀=0.8–1。將菌液放置冰上 5 至 15 分

表一、香蕉組織培養之培養基

Table 1. Media for culture of banana tissues

Components (mg/L)	Medium		
	TB5	YCP	BG
MS salt*	Full strength	Full strength	Full strength
thiamine-HCl	1	1	1
Nicotinic acid	0.5	0.5	0.5
pyridoxine	5	5	0.5
glycine	5	5	2
myo-inositol	100	100	100
glutamine	100		
biotin	1	1	
proline	230		
2,4-D	1	4	
IAA		1	
NAA		4	
picloram		1	
BA			1
GA			0.1
malt extract	500		
sucrose (g/L)	45	30	30
pH	5.6	5.7	5.6
Agar (g/L)	7	7	7



Supplement : 2,4-D, 2,4-diclorophenoxyacetic acid; IAA, indole-3-acetic acid; NAA, naphthaleneacetic acid; BA, benzyladenine; GA, gibberellic acid.

* : Murashige and Skoog, 1972.

鐘後，於 4°C 以 3700 rpm 離心 20 分鐘，去除上清液。加入 4°C 的 1 mL TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA-Na₂, pH 8.0)，重新懸浮菌塊，並移至 1.5 mL 的微量離心管中。於室溫以 13200 rpm 離心 1 分鐘，去除上清液。加入 200 μL 的 Solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA-Na₂, 25 mg/mL Lysozyme)，震盪混勻 5 分鐘。在冰上加入 400 μL Solution II (0.2N NaOH, 1% SDS)，混勻後於冰上靜置 9 分鐘。在冰上加入 300 μL Solution III (3 M KOAc, 11.5% acetic acid, pH5.2)，於冰上混勻後靜置 13 分鐘。於 4°C 以 13200 rpm 離心 5 分鐘，吸取上清液至新的 1.5 mL 的微量離心管中。加入 500 μL 冰冷的 isopropanal 混合均勻。於 4°C，13200 rpm 離心 5 分鐘之後，去除上清液。加入 135 μL TE (pH 8.0) 溶解 DNA。加入 100 μL PCI (phenol : chloroform : isoamyl alcohol = 25:24:1)，混勻後於室溫 13200 rpm 離心 2 分鐘，吸取上層水層至新的微量離心管，並再重複一次此 PCI 的步驟，以去除蛋白質與雜質。加入 100 μL CI (chloroform : isoamyl alcohol = 24:1)，混勻後於室溫 13200 rpm 離心 2 分鐘，吸取上層水層至新的微量離心管。加入 100 μL 4M 的 NH₄OAc 及 400 μL 100% 酒精，置於 -80°C 10 分鐘沉澱 DNA。於 4°C 離心 13200 rpm 10 分鐘，去除上清液。加入 200 μL 70% 酒精，於 4°C 離心 13200 rpm 5 分鐘後，去除上清液。加入 200 μL 100% 酒精，於 4°C 離心 13200 rpm 5 分鐘後，去除上清液。風乾沉澱物。加入適量的 TE (pH 8.0) 或無菌水溶解 DNA，置於 -20°C 保存備用。

(五) 農桿菌媒介法轉殖

將含有待轉殖的質體構築之農桿菌培養於含相對應抗生素之固態 YEB 培養基上，於 28°C 培養兩天，待長出單一菌落。接種單一菌落農桿菌於含有相對應抗生素之 YEB 液態培養基 20 mL，於 28°C，240 rpm 震盪培養兩天，培養至 O.D.₆₀₀ = 1。將菌液移至 50 mL 離心瓶以 4200 rpm 離心 20 分鐘，移除上清液，將農桿菌菌塊以 7.5 mL SHBA (液態 SH 培養基含 1

mM Bantain 及 0.1 mM Acetosyringone) 重新懸浮備用。將香蕉懸浮培養細胞吸取細胞液 5 mL 至 15 mL 無菌塑膠管中。將重新懸浮於 SHBA 的農桿菌菌液 5 mL 加入細胞液中，使總體積約為 10 mL，上下輕輕搖晃後倒入 125 mL 之三角瓶，避光震盪 60 rpm，將細胞與農桿菌共培養 2 小時。將共培養液均勻散佈於 3 片濾紙上，每片滴佈兩次，每次 4 mL。將含有細胞、農桿菌濾紙之培養皿，以石蠟膜封口後，於 25°C 避光靜置培養三天。培養三天後，以含 200 mg/L 抗生素 Cefotaxime 之液態 SH 培養基，沖洗濾紙以殺死農桿菌，每片兩次，每次 4 mL。沖洗完後，使菌液流乾，將濾紙移至含抗生素 G418 50 mg/L 及 Cefotaxime 100 mg/L 之固態 SH 培養基上，於 25°C 培養室中進行弱光培養，每 2 至 3 週繼代一次。待存活之細胞長成體胚，將其由濾紙上移至含 50 mg/L G418 抗生素之 1/2 BMS 固態培養基培養，待其發根、長芽。



二、香蕉 *Mh-ACO2* 基因默化轉殖株分析

(一) 植物材料

轉殖默化 *Mh-ACO2* 表現質體 pBI121-2AnS 的北蕉 (*Musa* spp. cv. Pei Chiao, AAA group) 轉殖株 (林, 2004; 李, 2006)。pBI121-2AnS 質體上帶有 *NPT II* 及 *GUS* 兩個報導基因供篩選之用。轉殖株栽培於國立台灣大學園藝學系轉殖溫室與精密溫室。非轉殖株 (wild type) 北蕉栽培於國立台灣大學園藝分場。

(二) GUS 活性組織化學染色分析

切取植物材料，置入 Triton 緩衝液 (50 mM NaPO₄, 1% Triton X-100, 0.1% 2-mercaptoethanol)，於 37°C 處理兩個小時。除去 Triton 緩衝液，加入 X-Gluc 緩衝液 (1 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic

acid, 50 mM NaPO₄, pH 7.0), 於 37°C 處理兩天。移去 X-Gluc 緩衝液, 加入脫色液 (95% 酒精:冰醋酸 = 7:3) 進行脫色及保存 (Jefferson, 1987; Becker et al.,2000)。

(三) 植物基因組 DNA 之抽取

試驗方法修改自 Dellaporta 等(1983), 剪取植物材料置入液態氮急速冷凍, 研磨成粉末狀移入 15 mL Extraction buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 10 mM 2-mercaptoethanol) 之 50 mL 離心管中, 於冰上加入 1 mL 20% SDS, 震盪混合 10 秒鐘 4 次後, 於 65°C 靜置 10 分鐘。加入 5 mL potassium acetate (KOAc), 混合均勻, 之後於冰上靜置 20 分鐘以上。離心後將上清液過濾, 加入 -20°C 的 10 ml isopropanol。溫和混合均勻, 於 -20°C 靜置 30 分鐘以上。離心後去除上清液, 放置風乾約 30 分鐘。加入 4°C 的 0.7 mL High-TE, 放置 4°C 15 分鐘至 4 小時, 溶解 DNA。將溶液移至 1.5 mL 微量離心管中, 離心後將上清液移入新的 1.5 mL 微量離心管中, 加入 75 µL 3M sodium acetate (pH 5.2) 及 500 µL -20°C isopropanol 均勻混合。於 4°C 離心沉澱 DNA。去除上清液, 加入 200 µL -20°C 的 70% EtOH 洗鹽, 於 4°C 離心後去除上清液, 加入 100 µL -20°C 的 100% ETOH 於 4°C 離心後去除上清液, 風乾 DNA。加入 100 µL TE (pH 8.0) 溶解 DNA。加入 3 µL RNase A (10mg/ml) 於 37°C 反應 30 分鐘, 以去除 RNA。測量 O.D.₂₆₀ 定量 DNA。之後將 DNA 保存於 -20°C 備用。

(四) 植物基因組 RNA 之抽取

剪取植物材料以液態氮研磨成粉末狀。移入含 20 mL 65°C Extraction buffer (2 M NaCl, 25 mM EDTA, pH 8.0, 100 mM Tris-HCl, spermidine 0.5 g/L, 3% Hexadecyl trimethyl-ammonium bromide, 3% polxviuyl-pyrrolidone-40, 0.4% 2-mercaptoethanol) 之燒杯中, 以均質機攪拌均勻。將均質後之材料移入 50mL 之塑膠離心管, 於 65 °C 處理 10 分鐘, 其間均

勻混合 3 次，待白色粉末出現。加入等量之 CI，上下溫和混勻 10 分鐘，離心後將上清液移至新的 50 mL 離心管，再加入等量之 CI，上下溫和混勻 10 分鐘，離心後將上清液移至玻璃離心管中，加入 1/3 倍體積之 8 M LiCl，再以 LiCl 將瓶兩兩平衡，溫和混勻後，置 4°C 沉澱過夜。以 4°C 離心後去除上清液。將底部的 RNA 溫和懸浮於 500 μ L 之 0.5% SDS 中，移至 1.5 mL 之微量離心管，加入等體積之 CI 震盪混合數秒。以 4°C 離心後將上清液移至新的 1.5 mL 微量離心管，並加入 2 倍體積之 100% 酒精，置於 -20°C，2 小時。以 4°C 離心後去上清液。加入 500 μ L 之 70% 酒精後，於 4°C 離心後去上清液。加入 500 μ L 之 100% 酒精後，於 4°C 離心後去上清液。風乾 RNA 沉澱。將 RNA 溶於適量之 DEPC 水中。進行濃度定量後保存於 -80°C 備用。

(五) 南方氏雜交分析

參照 Southern (1975) 的方法加以修飾，取材料之基因組 DNA，以限制酶切後，於 70°C 處理 5 分鐘，再加入 1/10 體積之 4 M NaCl，及 2.5 倍體積之 100% 酒精，於 -80°C 沉澱 30 分鐘。再依次以 70% 酒精、100% 酒精洗鹽與風乾，以 25 μ L TE (pH 7.5) 復溶後，加入 3 μ L 10X tracking dye，經 0.7% 之 agarose 膠體進行電泳分離。膠體先後以 0.25 N HCl、變性緩衝液 (1.5 M NaCl, 0.5 N NaOH) 與中和緩衝液 (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl) 各浸泡兩次，每次 15 分鐘。膠體經處理後轉漬於 Hybond N 尼龍膜 (Amersham)，將轉漬膜移至 60°C 的 5 X SSPE (1X SSPE 為 0.18 M NaCl，10 mM NaH₂PO₄，1 mM EDTA-Na₂，pH 7.4) 處理 5 分鐘，移出風乾。將轉漬膜以 UV 120 mJ/cm² 的 cross-linker (Spectrolinker XL-1500) 進行 crosslink 後，再以 80°C 真空乾燥 1 小時，固定 DNA。

核酸探針備製與同位素標定，參照 Feinberg 與 Vogelstein (1983) 所發展的 random primer labeling 方法，取 40 至 60 ng 之變性 DNA 為模板，

dATP、dGTP、dTTP 各 20 μM ，400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSA，50 μCi 333 nM [α - ^{32}P] dCTP 與 5 units Klenow DNA polymerase，反應液總體積為 50 μL 。於 37°C 下反應至少 1 小時後，加入 2 μL 0.5 M EDTA- Na_2 終止反應。再加入 8 μL tracking dye (50% glycerol，0.25% bromopheno blue)，將反應液通過 Sephdex-50 層析管柱，以 TE (pH 7.6) 淋洗，洗液分管收集，每管約 180 μL ，收集至染劑流出為止，以液態閃爍計數器進行測定，選取放射性最高的數管混合作為探針。使用前先煮沸 5 分鐘，再置於冰上備用。

將轉漬膜以預雜交溶液 (prehybridization solution) [6X SSPE，0.5% SDS，5 X BFP (100 X BFP 為 2% BSA，2% Ficoll-40000，2% PVP-360000)，50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 變性的 salmon sperm DNA，10% dextran sulfate]，在 65°C 下反應至少兩個小時，加入含有放射線標定探針的雜交溶液 (hybridization solution) (6 X SSPE，0.5% SDS，5 X BFP，50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 變性的 salmon sperm DNA，10% dextran sulfate)，於 65°C 下反應 16 小時以上，以 Wash I solution (2 X SSPE，0.1% SDS)，於室溫下洗 15 分鐘兩次，再以 Wash II solution (1 X SSPE，0.1% SDS) 於 65°C 下洗 15 分鐘兩次，最後利用 X 光片 (Kodak XAR film) 於 -80°C 曝光。

(六) 小片段 RNA 北方雜交分析

參照 Patterson 等 (1987) 及 Hamilton 等 (1999)，方法加以修飾，取材料之基因組 RNA，加入 10 μL Urea loading dye (8 M urea，20 mM EDTA- Na_2 ，之 5 mM Tris-HCl pH 7.5，0.5% bromphenol blue) 後，於 100°C 加熱 10 分鐘後，置於冰上備用。以含 8 M urea 之 15% polyacryamide 膠體，以預熱之 65°C 1 X TBE (10 X TBE 為 0.9 M Tris，0.9 M boric acid，20 mM EDTA) 當作電泳液，電壓以 250V 進行電泳分離，膠體利用轉移電泳槽 (Tanan VE-186) 將 RNA 轉漬於 Hybond N 尼龍膜 (Amersham) 上，轉漬電泳液為 0.5X TBE，電壓為 50 V，轉漬一小時。將轉漬膜移出風乾，以 UV

120 mJ/cm² 的 cross-linker (Spectrolinker XL-1500) 進行 crosslink 後，再以 80°C 真空乾燥 1 小時，固定 RNA。核酸探針備製與同位素標定方法，同南方雜交分析中所述。

將轉漬膜以預雜交溶液 (5 X SSPE, 50% formamide, 0.5% SDS, 5 X BFP, 在 42°C 下反應至少兩個小時，加入含有放射線標定探針的雜交溶液 (5 X SSPE, 0.5% SDS, 5 X BFP, 200 µg/mL 變性的 salmon sperm DNA, 10% dextran sulfate)，於室溫下反應 16 小時以上，以 Wash I solution (2 X SSPE, 0.1% SDS)，於室溫下洗 15 分鐘兩次，再以 Wash II solution (1 X SSPE, 0.1% SDS) 於 42°C 下洗 15 分鐘兩次，最後利用 X 光片 (Kodak XAR film) 於 -80°C 曝光。

(七) 反轉錄聚合酶連鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)

以基因組 RNA 當作模板，使用 One-Step RT-PCR Kit (GeneMark) 進行反應，反應液中包含，0.1 µg/µL 模板 RNA，50 ng/µL 引子，1X Reaction Mix，1 X Enhancer，2% Enzyme Mix。反應溫度為 50°C 30 分鐘，94°C 2 分鐘，之後 94°C 30 秒，59°C 30 秒，72°C 1 分鐘進行 35 個循環。最後再反應 72°C 10 分鐘，置於 4°C 備用。

本論文所使用之引子包含：

Mh-ACO1 基因：MAO13RT (5' -GAATCCCATGGTTCACCAGCTG- 3')

MAO15RT (5' -ATGGCGATTCCGGTCATCGATTTCT- 3')

Mh-ACO2 基因：MAO2-3RT (5' -ATTCCTTCATCGCCTTCCTA- 3')

MAO25RT (5' -ATGGATTTCCTTTCCGGTTATCGACA- 3')

香蕉 *actin* 基因：BACT3 (5' -GTAAGCAAGCTTCTCCTTGAT- 3')

BACT5 (5' -TAGCGGACGTACCACAGGTAT- 3')

(八)香蕉葉片創傷試驗

參照 Lopez-Gomez 等 (1997) 之方法加以修飾，將以香蕉新葉葉片切成 1 平方公分大小，分別浸泡於含 0.4 M mannitol，1% 2-mercaptoethanol 與 1 mM ACC 之緩衝液中 15 分鐘後，置於以相同緩衝液潤濕之濾紙上，於 25°C 避光培養，並於不同時間點，進行觀察及材料收集。並取部分葉片材料，處理 1% (v/v) Fluorescein Diacetate (FDA) 3 分鐘後，於顯微鏡下觀察細胞存活狀態。

(九)香蕉果實後熟試驗

試驗用香蕉果實，在綠熟階段分開各果指清洗之後，以石油脂 (vaseline) 塗抹切口，自然風乾後備用。本次後熟試驗，分別採取自然後熟以及外施乙烯催熟兩部分。自然後熟部分，將各果指放置於 25°C，使其自然後熟。外施乙烯催熟部分，於 25°C 下，將果實放置於密封之呼吸缸之中，呼吸缸內含有濃度 500 ppm 之乙烯，進行處理 24 小時，移出香蕉果實，於抽風櫥中去除殘存乙烯後，放置於 25°C 使其後熟。

(十)香蕉果實後熟之果皮顏色指數

香蕉果實後熟之程度，一般常用之方式，為觀察果皮轉色的程度，並依據果色指數 (color index) 進行分級 (CSIRO, 1972)，將果皮顏色由綠色至生理斑出現，共分成 8 級：第 1 級為全綠 (all green)，第 2 級為綠色帶極微黃 (green – trace of yellow)，第 3 級為綠色多於黃色 (more green than yellow)，第 4 級為黃色多於綠色 (more yellow than green)，第 5 級為兩端綠 (green tip)，第 6 級為全黃 (all yellow)，第 7 級為生理斑點出現 (yellow – flecked with brown)，第 8 級為斑點擴大 (yellow with large brown areas)。

(十一) 香蕉果實呼吸率測定

分別將香蕉果實單一果指，經過秤重後，置於 1 L 之密封呼吸缸中，

於 25°C 靜置 1 小時後，吸取 1 mL 呼吸缸中之氣體，以氣相層析儀 [日本島津公司 GC-8AIT，搭配熱傳導檢測器 (Thermal conductivity detector, TCD)]，進行二氧化碳的測定，分離管柱為 1/8" × 6 ft 的不鏽鋼管柱，管柱內填充 Porapak Q，80-100 mesh，管柱烘箱溫度定為 40°C，注射口溫度設定為 80°C，以氫氣為載行氣體，壓力設定在 1 kg/cm²。

經氣相層析儀檢測後所得之二氧化碳高峰長度，計算香蕉果實呼吸率：

呼吸速率(ml CO₂/g/hr) =

$$\frac{[\text{樣品峰高}-\text{空白峰高}]}{\text{標準氣體峰高}} \cdot \text{標準氣體濃度}(\%) \cdot 1/100 \cdot \text{總體積}(\text{ml})$$

$$\text{樣品重量}(\text{g}) \cdot \text{時間}(\text{hr})$$

(十二) 香蕉果實乙烯生成量測定

分別將香蕉果實單一果指，經過秤重後，置於 1 L 之密封呼吸缸中，於 25°C 靜置 1 小時後，吸取 1 mL 呼吸缸中之氣體，以氣相層析儀 [CHROMPACK CP9001，搭配火焰離子檢測器 (Flame ionization detector, FID)]，進行乙烯的測定，分離管柱為 1/8" × 6 ft 的不鏽鋼管柱，管柱內填充活性氧化鋁 (activated alumina)，80-100 mesh，管柱烘箱溫度定為 90°C，注射口溫度設定為 150°C，偵測器溫度設定 130°C，以氫氣為載行氣體，壓力設定在 20 kPa。燃燒氣體為氫氣與空氣。

經氣相層析儀檢測後所得之乙烯高峰長度，計算香蕉果實乙烯生成量：

乙烯生成量(μL C₂H₄/g/hr) =

$$\frac{[\text{樣品峰高}-\text{空白峰高}]}{\text{標準氣體峰高}} \cdot \text{標準氣體濃度}(\text{ppm}) \cdot \text{總體積}(\text{ml})$$

$$\text{樣品重量}(\text{g}) \cdot \text{時間}(\text{hr})$$

肆、結果

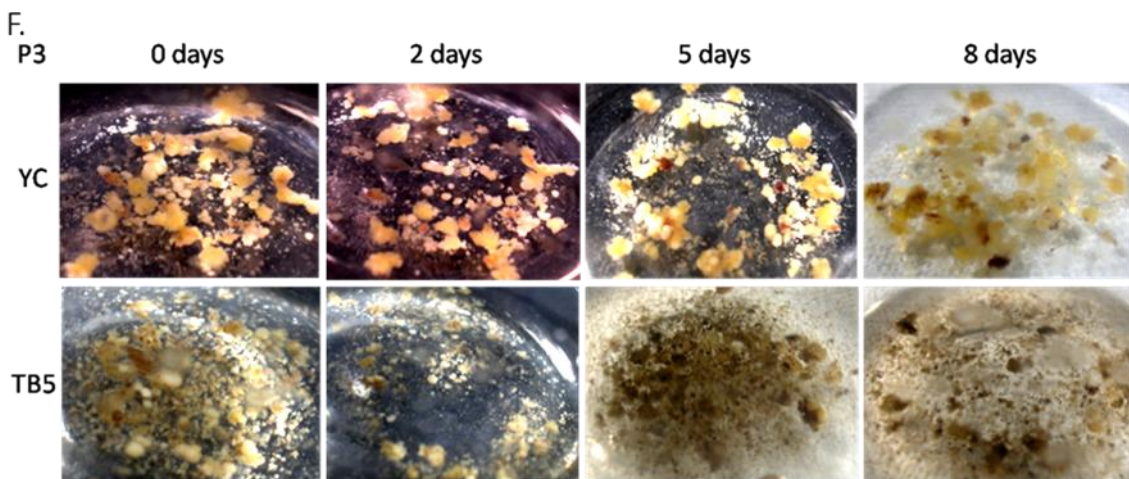
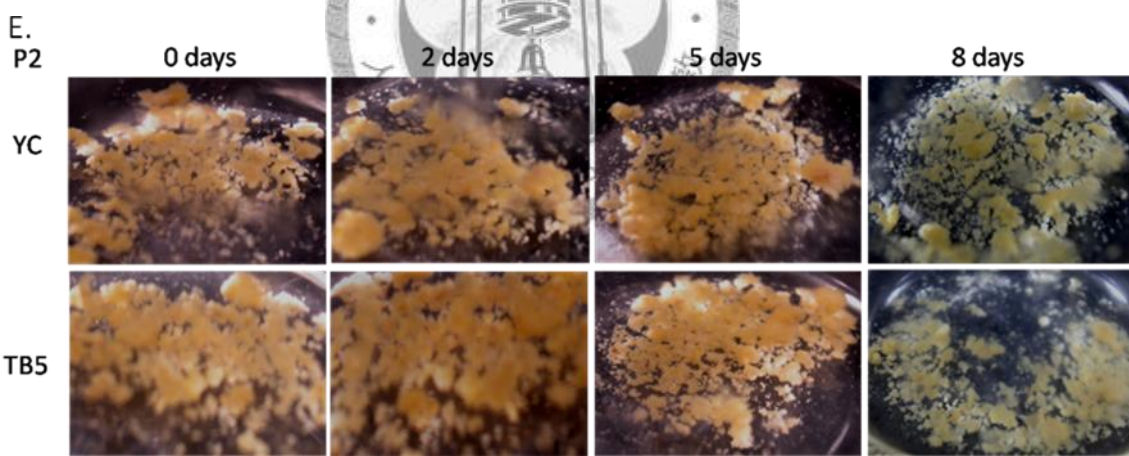
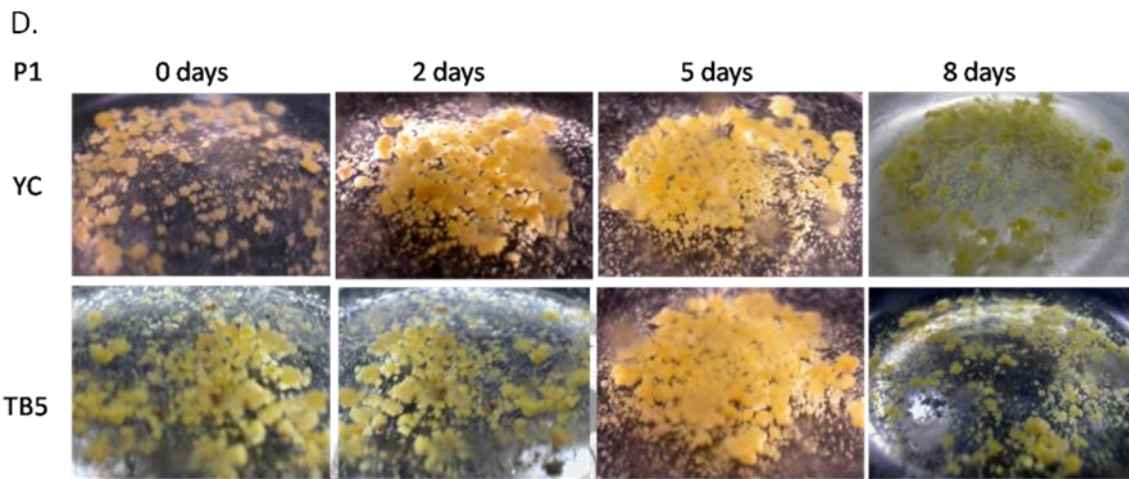
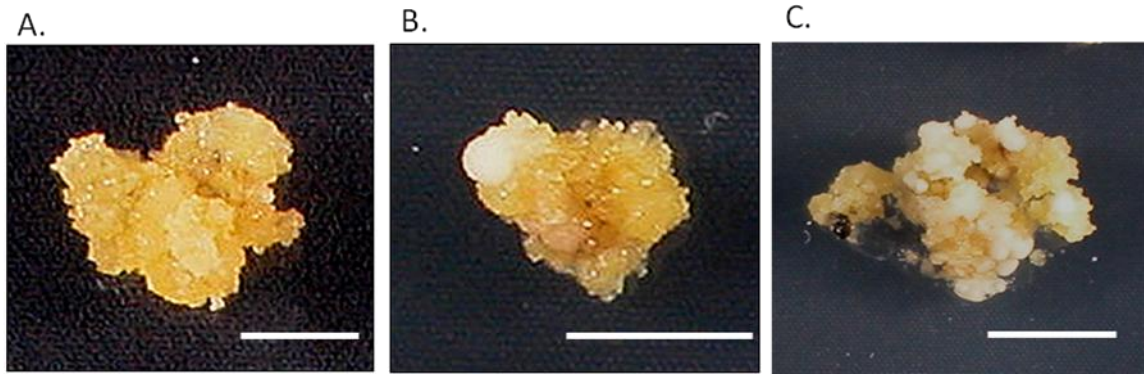
一、香蕉 *Mh-ACO1* 基因默化轉殖

(一) 北蕉懸浮細胞之建立

將培養於 YC 固態培養基上之北蕉癒合組織，依照組織的顆粒性、顏色及胚化狀態，將癒合組織分成三類 (圖二 A、B 和 C)，第一類 (P1) 顆粒最為細緻，無透明水晶狀，顏色偏黃，培養期間偶有擬胚出現之癒合組織；第二類 (P2) 顆粒性較大，參雜部分透明水晶狀組織，顏色偏黃白色，具有少許擬胚之癒合組織；第三類 (P3) 顆粒性最大，具多量透明水晶狀組織，顏色偏白色，具多量擬胚的癒合組織。將此三類之癒合組織分別移入 YC 或 TB5 液態培養基中，進行懸浮培養，以建立北蕉懸浮細胞，結果顯示，第一類癒合組織，不論在 YC 或者是 TB5 液態培養基中培養，均能增生出具游離狀態之單細胞群，顏色鮮黃，狀態細緻濃密，培養期間偶有擬胚的發生 (圖二 D)。第二類癒合組織，懸浮培養於 YC 或 TB5 液態培養基中，均能產生游離狀態之細胞群，顏色偏黃白色，顆粒性較大，具有部分較大且透明狀之細胞出現，培養期間有多量的擬胚發生 (圖二 E)。第三類癒合組織，懸浮培養於 YC 液態培養基中之組織，會分裂出團塊較小的細胞群，但數量稀少，顏色偏白、褐色，且隨著培養時間的拉長，會有部分褐化細胞、組織出現；而如果懸浮培養於 TB5 液態培養基中，第三類癒合組織，會在 5 天內即呈現褐色的褐化狀態，並且也有大量細胞及組織變成黑褐色死亡狀態 (圖二 F)。

(二) 經農桿菌媒介法轉殖之北蕉細胞抗性篩選

將北蕉懸浮培養細胞，利用農桿菌媒介法進行轉殖，經含默化 *Mh-ACO1* 基因默化表現載體 pBI121-1AnS 之農桿菌，共培養感染三天後，轉移至誘導體胚發生之 SH 固態培養基上，並利用抗生素 G418 進行篩選，



圖二、香蕉 (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group) 癒合組織與細胞培養

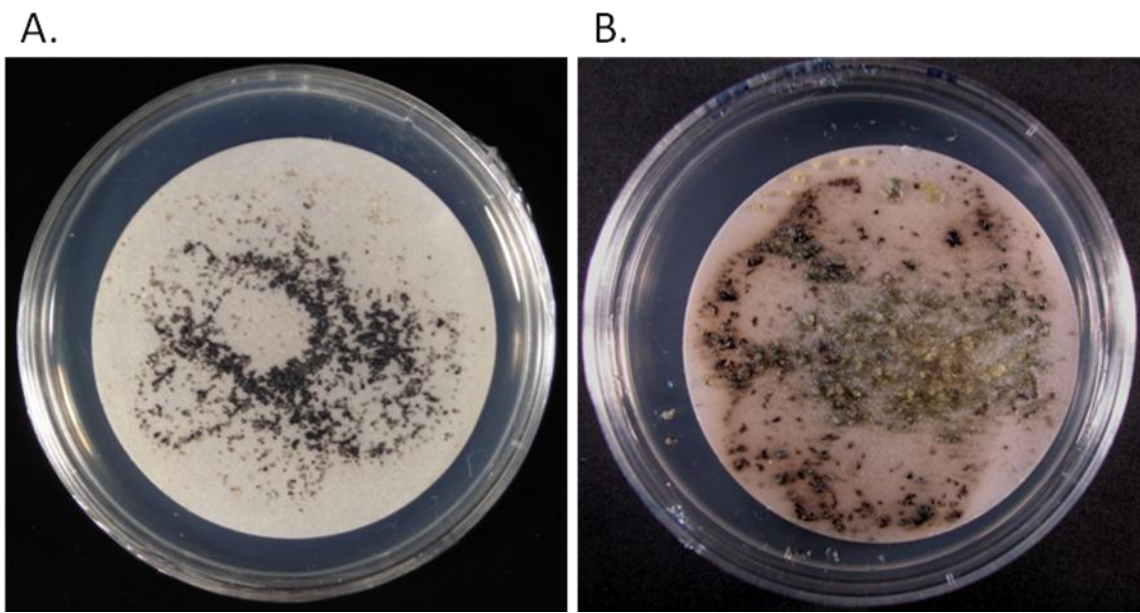
Fig. 2. Banana (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group) callus and suspension culture cells. A. Morphology of type 1 banana callus (P1). B. Morphology of type 2 banana callus (P2). C. Morphology of type 3 banana callus (P3). D to E. Type 1 to 3 banana suspension cells were cultured in YC or TB5 medium. Bar = 5 mm.



篩選濃度分為 25 mg/L 及 50 mg/L。結果顯示，於 50 mg/L G418 抗生素濃度下篩選的北蕉擬轉殖細胞，在兩週內即迅速呈現黑褐色死亡狀態，且無任何擬胚發生 (圖三 A)。而培養於濃度 25 mg/L 之 G418 抗生素的北蕉擬轉殖細胞，篩選四週後，可發現大部分細胞呈現黑褐色死亡狀態，而其中有數十顆擬胚的發生。由此可觀察到，相較於 50 mg/L 的 G418 抗生素濃度，25 mg/L 的濃度，可順利殺死未轉殖北蕉細胞，且擬轉殖細胞可於此篩選濃度下存活，具有明顯篩選效果，並且存活之擬轉殖細胞於四週後順利形成擬胚 (圖三 B)。

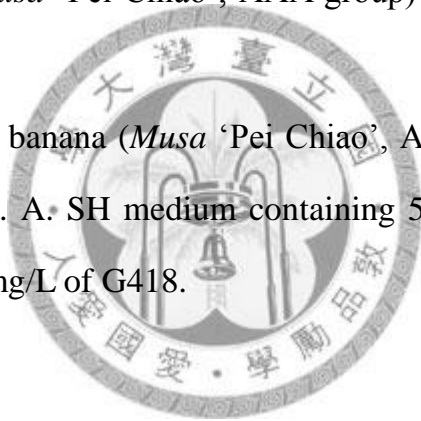
(三) 農桿菌媒介法轉殖之北蕉細胞生長分化

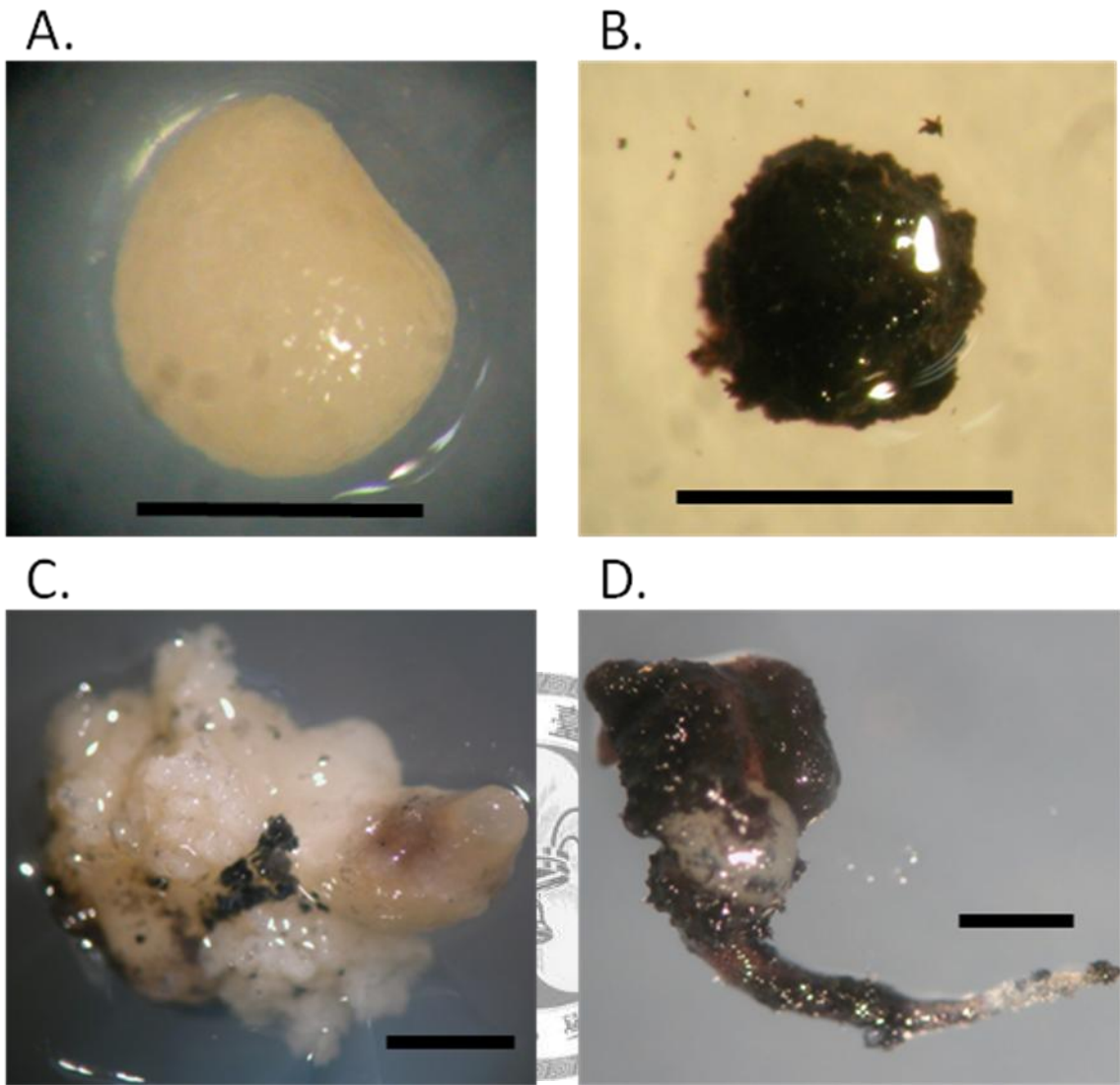
北蕉懸浮細胞利用農桿菌媒介法轉殖默化 *Mh-ACO1* 基因默化表現載體 pBI121-1AnS 後，培養於含濃度 25 mg/L G418 抗生素的 SH 固態培養基上，以誘導體胚發生。北蕉細胞經過篩選兩週後，未轉殖成功之細胞會呈現黑褐色死亡，擬轉殖細胞經過培養，會形成擬胚 (圖四 A 和 B)。培養約一個月後，即有體胚的形成，此時將轉殖篩選濃度提高至 50 mg/L，繼續進行篩選。培養約三個月後，體胚可見有初期的根狀體構造形成 (圖四 C)。培養約五個月後，體胚即可見到胚根的形成 (圖四 D)。



圖三、擬轉殖香蕉 (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group) 細胞以 G418 抗生素進行篩選

Fig. 2. The transformed banana (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group) cells kept on G418 selecting medium. A. SH medium containing 50 mg/L of G418. B. SH medium containing 25 mg/L of G418.





圖四、擬轉殖香蕉 (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group) 細胞生長分化情形

Fig. 2. Growth pattern of the transformed banana (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group) cells. A. Small embryo. B. Dead cell. C. Embryo with root-like structure. D. Embryo with developed root. Bar = 1 mm.

二、香蕉 *Mh-ACO2* 基因默化轉殖株分析

(一) GUS 活性組織化學染色分析

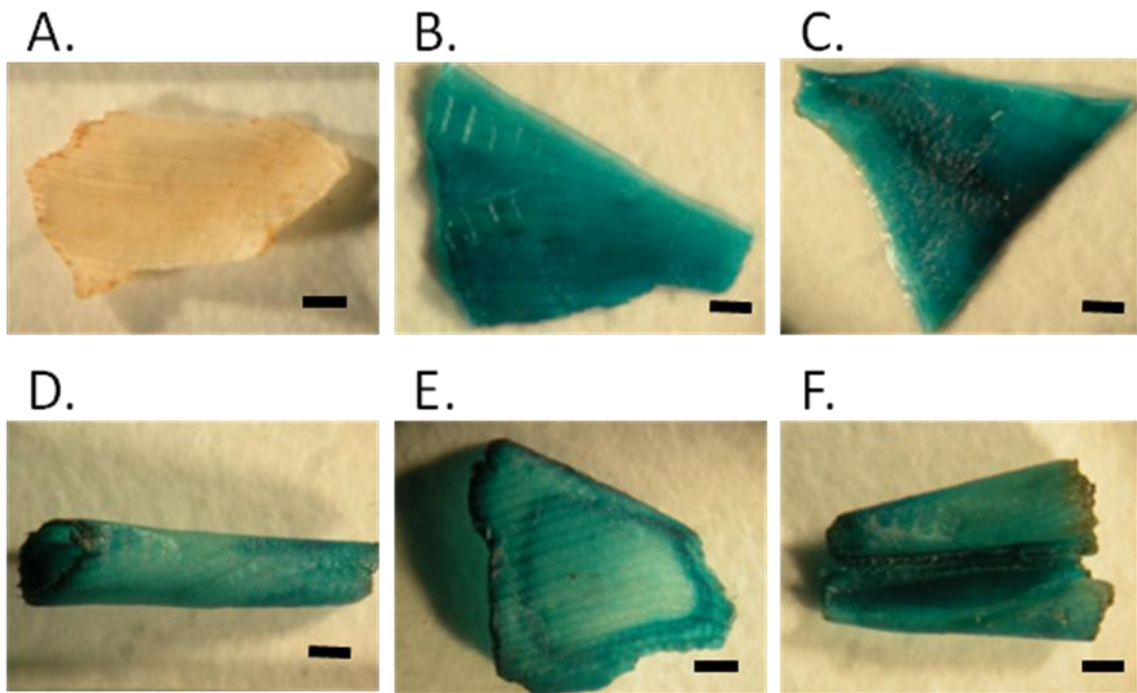
轉殖默化 *Mh-ACO2* 表現質體 pBI121-2AnS 的北蕉擬轉殖株，取新葉葉片進行 GUS 活性組織化學染色分析。經染色後葉片組織呈現藍色反應者，即表示轉殖片段已經穩定轉移進入材料組織中，並可正常表現 *GUS* 報導基因，反之如未轉殖之控制組材料，則未有呈色反應 (圖五)。

(二) 南方氏雜交分析

針對擬轉殖株進行南方氏雜交分析檢測，目的為了解轉殖片段插入之拷貝數及位置差異，利用 *Xho* I 酵素對轉殖株基因組 DNA 進行酶切，以 *GUS* (1872 bp, 圖六 A) 及 *Mh-ACO2* (156 bp, 圖七 A) 基因片段當作探針，預估偵測片段大於 4346 bp。結果顯示，依照插入位置的差異，可將轉殖株可分為三群，轉殖株編號 2AS-6 及 2AS-80 為一群，編號 2AS-1、2AS-49 及 2AS-79 為第二群，編號 2AS-33、2AS-82 及 2AS-87 為第三群，並且所有轉殖株均為多拷貝的插入(圖六 B 和圖七 B)，並且已為穩定之轉殖。

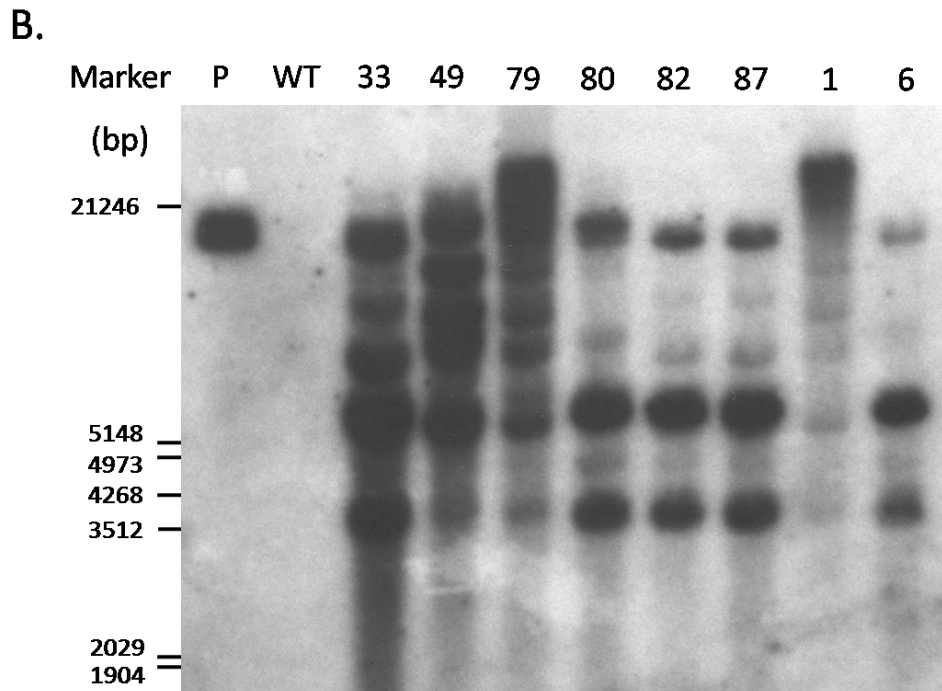
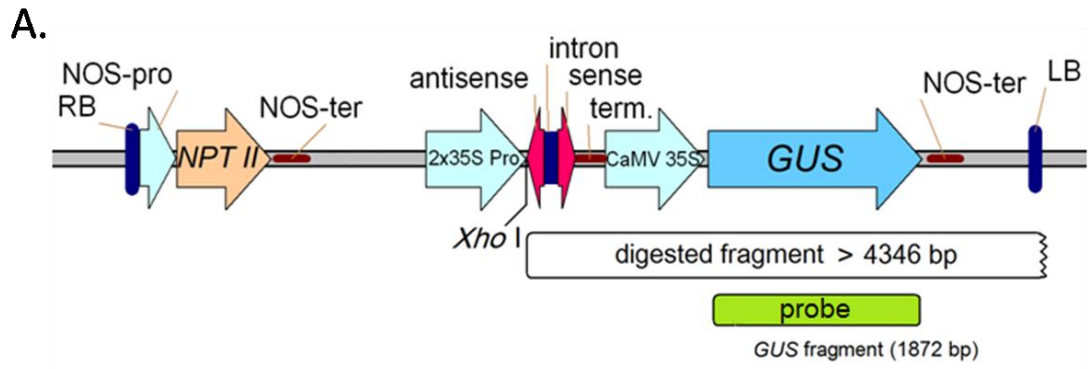
(三) *Mh-ACO2* 默化轉殖北蕉植株生長情形

與未轉殖北蕉植株相比，*Mh-ACO2* 默化北蕉轉殖株在組織培養期間、定植後，直到株高約 1.5 公尺前，生長情形與未轉殖對照株均無明顯差異 (圖八 A - H)。繼續栽培約五個月後 (96 年 8 月至 97 年 1 月)，未轉殖對照株生長至株高 3 公尺以上，健葉數約 10 片，但轉殖株株高均僅約 2.5 公尺，而健葉數與對照株相似，亦約為 10 片葉 (圖八 I 和 J)。轉殖株編號 2AS-79 於 97 年 1 月抽穗 (圖八 J)，1 月 23 日包覆第一果手之苞片開始展開，可見其內有十三朵雌花，至第四果手雌花開完，總計 4 個果手，30 根果指 (圖八 L)。



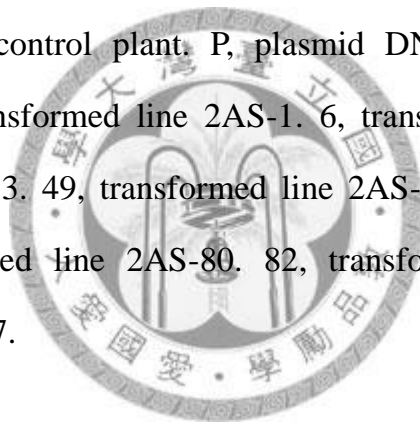
圖五、轉殖默化 *Mh-ACO2* 表現質體 pBI121-2AnS 之香蕉 (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group) 擬轉殖株葉片 GUS 活性組織化學染色分析

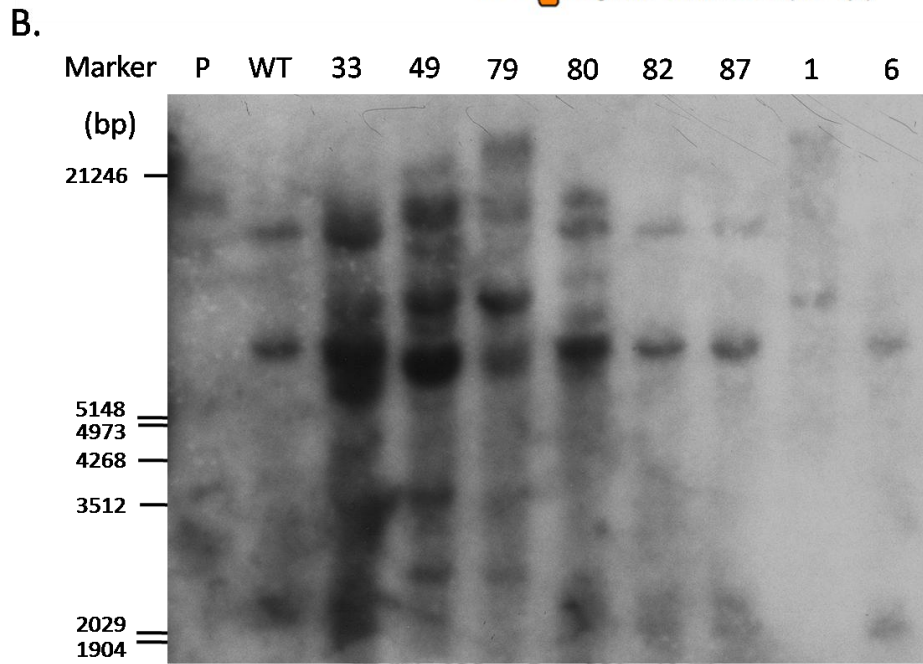
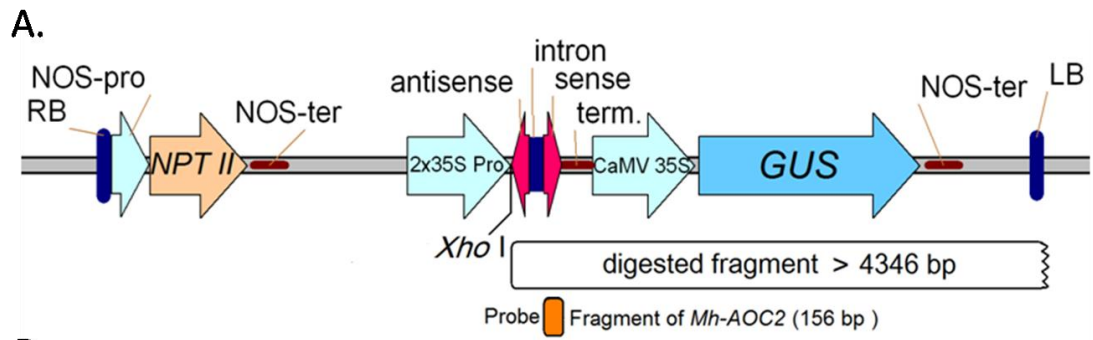
Fig. 5. Histochemical GUS stain of putative transformed banana (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group) leaves. A. Non-transformed control banana leaf. B. Transformed line 2AS-1. C. Transformed line 2AS-6. D. Transformed line 2AS-79. E. Transformed line 2AS-80. F. Transformed line 2AS-87. Bars = 1 mm.



圖六、轉殖默化 *Mh-ACO2* 表現質體 pBI121-2AnS 的香蕉 (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group) 擬轉植株基因基因組以 *GUS* 基因為探針之南方氏雜交分析結果

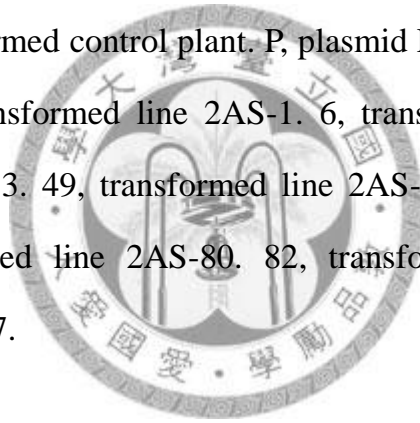
Fig. 6. Genomic Southern analysis of putative transformed banana (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group) plants. A. The T-DNA region in the plasmid construct pBI121-2AnS used for plant transformation. The position of hybridization probe and the expected hybridization fragment are also shown. LB, Left border. RB, Right border. Pro., Promoter. Ter., Terminator. B. Genomic Southern map. Hybridization signal of southern analysis genomic DNA was digested with *Xho*I, and hybridized with ³²P-labelled *GUS* gene (1872 bp) was used as probe. WT, non-transformed control plant. P, plasmid DNA of pBI121-2AnS as positive control. 1, transformed line 2AS-1. 6, transformed line 2AS-6. 33, transformed line 2AS-33. 49, transformed line 2AS-49. 79, transformed line 2AS-79. 80, transformed line 2AS-80. 82, transformed line 2AS-82. 87, transformed line 2AS-87.





圖七、轉殖默化 *Mh-ACO2* 表現質體 pBI121-2AnS 的香蕉 (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group) 擬轉植株基因基因組以 *Mh-ACO2* 基因為探針之南方氏雜交分析結果

Fig. 7. Genomic Southern analysis of putative transformed banana (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group) plants. A. The T-DNA region in the plasmid construct pBI121-2AnS used for plant transformation. The position of hybridization probe and the expected hybridization fragment are also shown. LB, Left border. RB, Right border. Pro., Promoter. Ter., Terminator. B. Genomic Southern map. Hybridization signal of southern analysis genomic DNA was digested with *Xho*I, and hybridized with ³²P-labelled *Mh-ACO2* gene (156 bp) was used as probe. WT, non-transformed control plant. P, plasmid DNA of pBI121-2AnS as positive control. 1, transformed line 2AS-1. 6, transformed line 2AS-6. 33, transformed line 2AS-33. 49, transformed line 2AS-49. 79, transformed line 2AS-79. 80, transformed line 2AS-80. 82, transformed line 2AS-82. 87, transformed line 2AS-87.





圖八、轉殖默化 *Mh-ACO2* 表現質體 pBI121-2AnS 的香蕉 (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group) 轉殖株生長情形

Fig. 8. Growth pattern of transgenic banana (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group) plants. A, C, E, G, and I are non-transformed control banana plants. B, D, F, H, and J are transgenic banana plants. K, Non-transformed control banana fruits. L. Transgenic banana fruits.

(四) 不同轉植株系間 *Mh-ACO2* 基因表現

利用 RT-PCR 檢測不同轉植株間 *Mh-ACO2* 表現情形，以新葉組織材料總 RNA 進行試驗。結果顯示，與未轉殖之香蕉新葉總 RNA 相比，轉植株中的 *Mh-ACO2* 表現量均有減少之情形，且不同轉植株間，默化效果有程度上之差異 (圖九)。以未轉殖控制組 *Mh-ACO2* 表現量當作 100 %，其中轉植株系編號 2AS-1 轉植株，*Mh-ACO2* 基因表現降低 79.3 %，2AS-6 降低 96.0 %，2AS-78 降 86.3 %，2AS-79 降 54.4 %，2AS-80 降低 89.2 %，2AS-82 降低 96.0 %，2AS-87 降低 37.8 %。

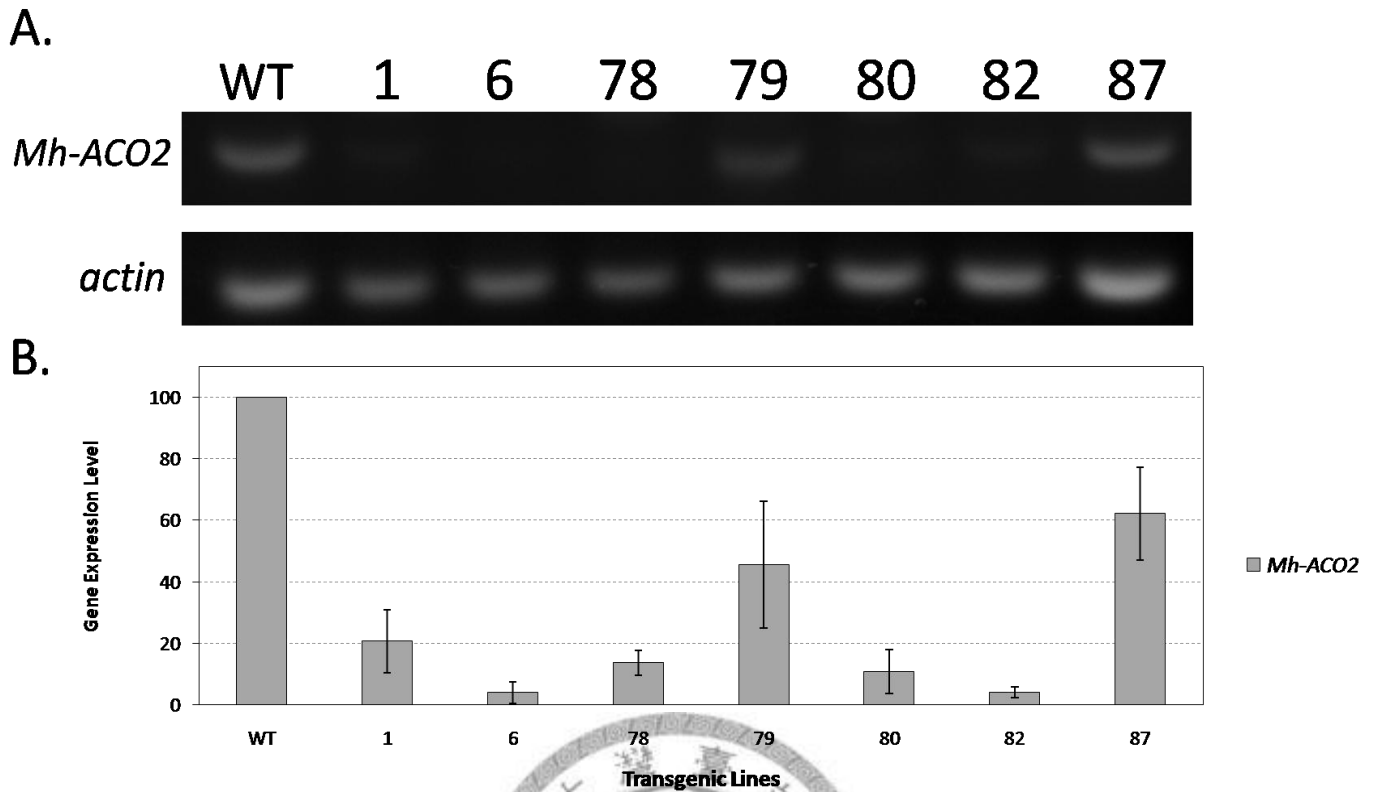
(五) siRNA 表現於 *Mh-ACO2* 基因默化轉植株

利用 RNA 干擾技術，默化目標基因，會產生 21 至 27 nt 大小的 RNA 片段，利用北方雜交分析檢測此些小片段 RNA，以確認 RNA 干擾表現情形。以編號 2AS-79 轉植株之雄蕊、雌蕊、花瓣、子房及苞片組織，抽取總 RNA，再利用 RNA 變性聚丙烯醯胺膠體 (denatured polyacrylamide gel) 進行電泳分離小於 100 nt 以下之 RNA，並利用 *Mh-ACO2* 之 cDNA 當作探針進行檢測。結果顯示 (圖十)，在 2AS-79 轉植株之花瓣部位，檢測到 siRNA 之表現，片段大小約為 25 – 27 nt，由此結果得知，RNA 干擾作用確實的執行於轉植株之中。但在雄蕊、雌蕊、子房及苞片組織，則未檢測到明顯 siRNA 表現，此結果指出，RNAi 的作用與 siRNA 的產生量，具有組織器官間的差異表現。

(六) 香蕉 ACC 氧化酶基因於創傷逆境之表現

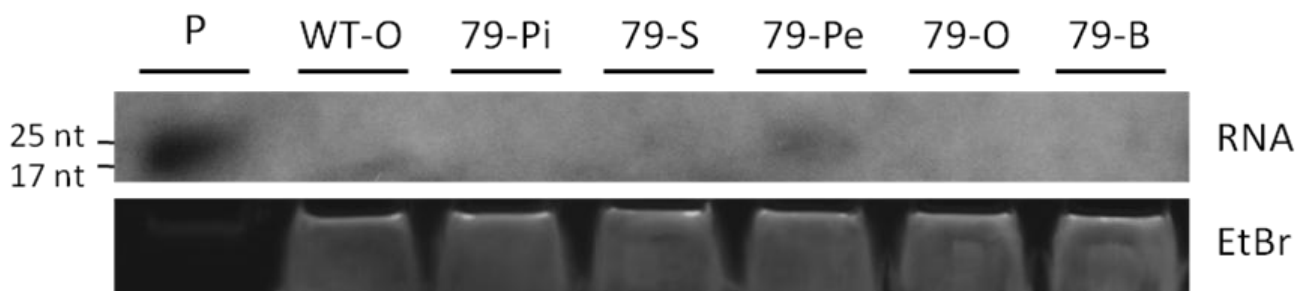
在植物中乙烯會受到創傷逆境的誘導產生，期望經由創傷處理，觀察香蕉葉片表現情形，並進一步觀察兩個 ACC 氧化酶基因 *Mh-AOCl* 與 *Mh-ACO2*，在 *Mh-ACO2* 默化轉植株中，是否受到影響而有差異性的表現。

將香蕉葉片切成 1 平方公分，之後分別浸泡於含 0.4M mannitol 或 1% β -Mercaptoethanol 或二者均有之緩衝液之中，處理 15 分鐘後，擺置在含



圖九、轉殖默化 *Mh-ACO2* 表現載體 pBI121-2AnS 之北蕉 (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group) 轉殖系 *Mh-ACO2* 表現

Fig. 9. *Mh-ACO2* gene expression in transformed pBI121-2AnS banana lines (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group). Total RNA were extracted from young leaves of banana. A. RT-PCR electrophoresis map of *Mh-ACO2* expression. B. *Mh-ACO2* expression vertical bar chart. Bars indicate the gene expression levels in different transgenic lives relative to the wild type control. WT, wild type (non-transformed control). 1, transgenic line 2AS-1. 6, transgenic line 2AS-6. 78, transgenic line 2AS-78. 79, transgenic line 2AS-79. 80, transgenic line 2AS-80. 82, transgenic line 2AS-82. 87, transgenic line 2AS-87.



圖十、默化 *Mh-ACO2* 之香蕉 (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group) 轉植株 2AS-79 siRNA 表現情形

Fig. 10. The siRNA expression of *Mh-ACO2* silenced transgenic banana (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group) line 2AS-79. 32 P-labelled *Mh-ACO2* cDNA (1267 bp) was used as probe. Hybridization temperature was room temperature. P, 25 nt and 17nt oligonucleotides (specific for *Mh-ACO2* gene) as positive control. WT-O, ovary of non-transformed control banana. 79-Pi, Pistil of 2AS-79. 79-S, Stamen of 2AS-79. 79-Pe, Petal of 2AS-79. 79-O, Ovary of 2AS-79. 79-B, Bract of 2AS-79. EtBr, EtBr stained RNA for loading control.

有或無濾紙上放置處理，濾紙以相同處理之緩衝液潤濕，於不同時間點進行觀察（圖十一）。結果指出，於含水之濾紙上或處理 0.4 M mannitol 之情況下，創傷後之葉片放置達 30 小時，形狀仍可保持完整，未有乾枯情形。而未施加任何處理之葉片在 1 個小時內即開始捲枯。僅施以無菌水處理之試驗組，在 18 小時後即立刻乾枯，且在割傷部位出現嚴重褐化現象。只施用 1 % β -Mercaptoethanol 之處理組亦有相似之表現，但褐化效果較為延遲，至 24 小時方有明顯之表徵。在創傷部位附近之細胞情形，可發現在所有不含 1 % β -Mercaptoethanol 之試驗組中，均在切傷後 0 小時即立即有組織褐化的情形。利用 FDA 染色法進行染色，以顯微鏡觀察 30 小時後在創傷部位附近之細胞存活狀態（圖十二），僅處理 0.4 M mannitol 的處理中，在創傷切口造成褐化組織上，此區的細胞均呈現死亡狀態，而如含有 1 % β -Mercaptoethanol 之處理下，切口部位放置達 30 小時，也仍未有明顯細胞死亡現象。

利用 RT-PCR 觀察 *Mh-ACO2* 默化轉殖株葉片中 *Mh-ACO1* 與 *Mh-ACO2*，在創傷逆境下的表現情形。結果顯示，在創傷處理下，不論對照株或轉殖株，*Mh-ACO1* 均會被誘導表現（圖十三），並在 12 小時達到表現高峰，且對照株與默化 *Mh-ACO2* 轉殖株的 *Mh-ACO1* 表現量，無明顯差異。而在 *Mh-ACO2* 表現上（圖十三），在對照株與轉殖株中，均呈現低量且持平的穩定表現，而轉殖株中的 *Mh-ACO2* 表現量均低於對照株。

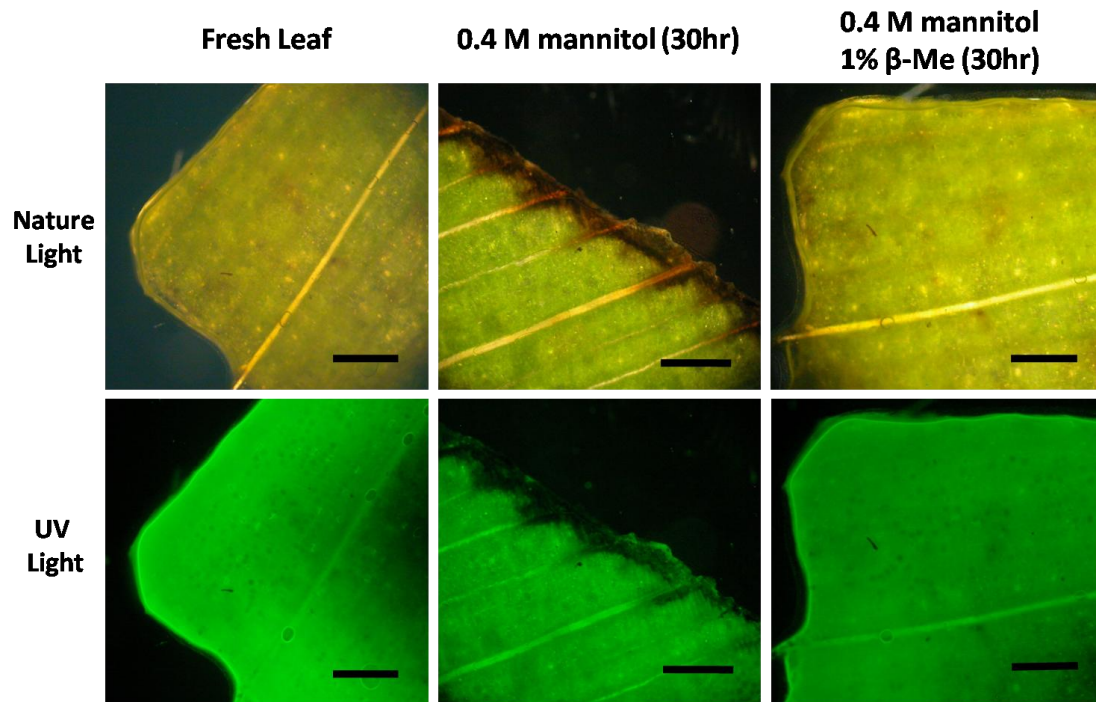
(七) ACC 氧化酶基因於 *Mh-ACO2* 默化轉殖株之不同器官表現

利用 RT-PCR 觀察 *Mh-ACO2* 默化轉殖株 2AS-79 中，*Mh-ACO1* 與 *Mh-ACO2* 在葉、雄蕊、雌蕊、花瓣、子房及苞片等組織的表現情形。結果顯示（圖十四），在未轉殖對照株與轉殖株中，*Mh-ACO1* 基因，在葉片中表現最少，而在雄蕊、雌蕊、花瓣、子房及苞片等生殖器官上，均發現 *Mh-ACO1* 呈現大量的表現。未轉殖株對照株與轉殖株在此些器官中，

		0 hr	1 hr	6 hr	18 hr	24 hr	30 hr
without buffer							
H ₂ O only	No filter						
	Wet filter						
1% β -Me	No filter						
	Wet filter						
0.4M mannitol	No filter						
	Wet filter						
1% β -Me and 0.4M mannitol	No filter						
	Wet filter						

圖十一、香蕉 (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group) 葉片創傷處理

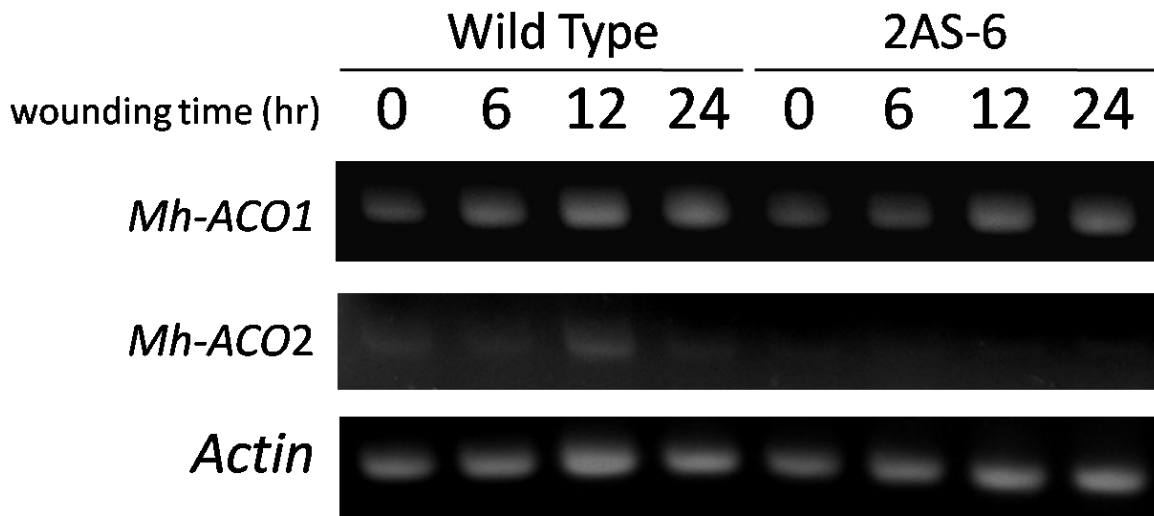
Fig. 11. Wounding treatment of banana (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group) leaves. Each leaf disc was cut from banana young leaves to 1 cm diameter, treated with H₂O, 1 % β -Mercaptoethanol, 0.4 M mannitol or 1 % β -Mercaptoethanol plus 0.4 M mannitol buffer for 15 minutes, and then incubated for 0, 1, 6, 18, 24 or 30 hours at 25°C.



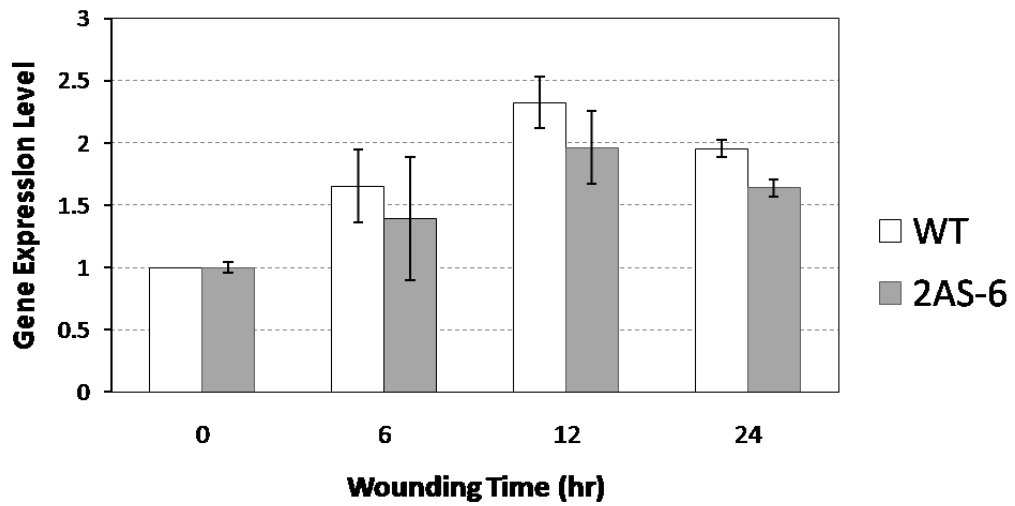
圖十二、香蕉 (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group) 葉片創傷處理之 FDA 染色分析

Fig. 12. FDA stain of wounding treatment banana (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group) leaves. Each leaf disc was cut from banana young leaves to 1 cm diameter and treated by 0.4 M mannitol or 1% β -Mercaptoethanol and 0.4 M mannitol for 15 minutes, then incubated for 30 hours at 25°C. Each wounded leaf disc was stained by 1% (v/v) FDA for 3 minutes.

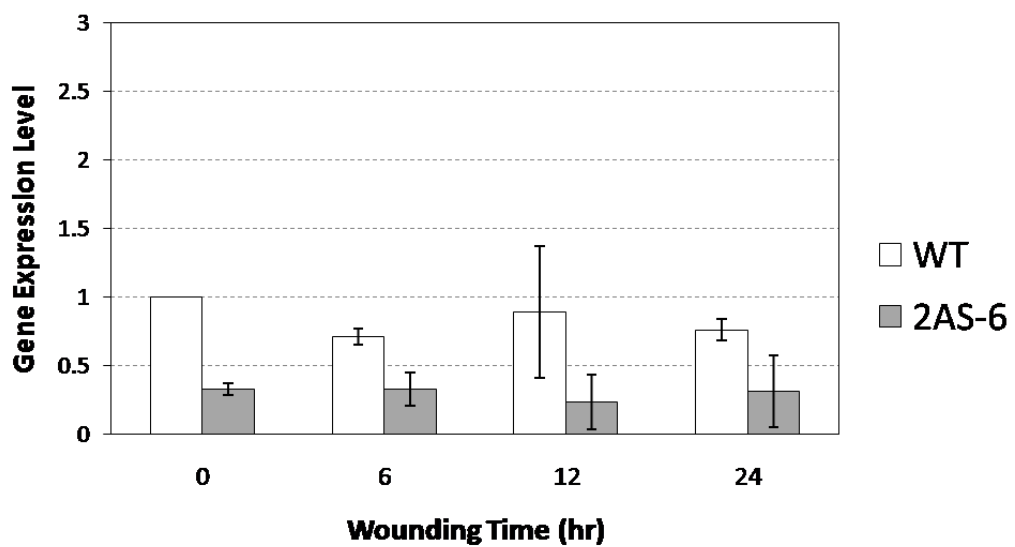
A.



B.



C.



圖十三、ACC 氧化酶基因於創傷默化 *Mh-ACO2* 轉殖香蕉 2AS-6 (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group) 葉片中之表現

Fig. 12. ACC oxidase gene expression in wounded leaves of *Mh-ACO2* silenced transgenic banana (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group) line 2AS-6. Total RNA were extracted from wounded young leaves of banana. A. RT-PCR electrophoresis map of *Mh-ACO1* and *Mh-ACO2* expression. B. *Mh-ACO1* expression vertical bar chart. C. *Mh-ACO2* expression vertical bar chart. WT, non-transformed control. 2AS-6, transgenic *Mh-ACO2* silenced transgenic banana line 2AS-6. Bars indicate the expression levels in different wounding time relative to the 0 hr in WT. Bars indicate the expression levels in different wounding time relative to the 0 hr in wild type.



Mh-ACO1 表現量無明顯差異。

觀察 *Mh-ACO2* 於未轉殖對照株與 *Mh-ACO2* 默化轉殖株，在葉、雄蕊、雌蕊、花瓣、子房及苞片等組織中的表現情形。結果顯示 (圖十五)，在未轉殖對照株中，*Mh-ACO2* 基因，除了在葉片中表現較少外，在雄蕊、雌蕊、花瓣、子房及苞片等生殖器官上，均發現 *Mh-ACO2* 呈現大量的表現。與對照株相比，轉殖株在花瓣、雄蕊及雌蕊上，*Mh-ACO2* 基因表現量有明顯的默化效果 (圖十五 B)，在花瓣中抑制了 71.0 % 的 *Mh-ACO2* 表現，在雄蕊中默化效果達 61.5 %，在雌蕊中降低了 60.5 % 的 *Mh-ACO2* 表現量，而在轉殖株葉片中的表現，轉殖株相似，表現量均較少，另外，在子房與苞片中，與未轉殖對照株相比，*Mh-ACO2* 則無明顯降低情形，表現量與對照株相似。

(七) *Mh-ACO2* 默化轉殖香蕉之果實後熟表現

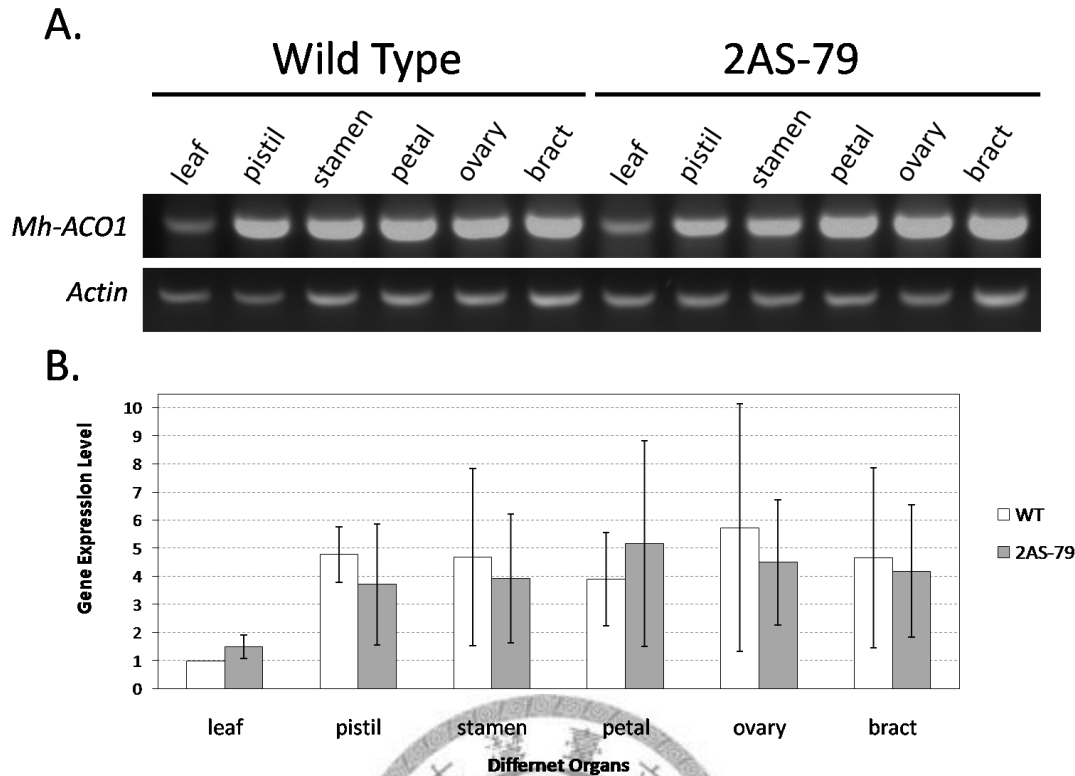
本次後熟試驗，分別採取自然後熟以及外施乙烯催熟兩部分。並分別針對兩類果實後熟情形進行觀察，主要觀察項目包括後熟果實之果皮轉色程度、後熟果實之呼吸率變化，以及後熟果實之乙烯生成量的表現。自然後熟之處理乃將各果指放置於 25°C，使其自然後熟。外施乙烯催熟部分，於 25°C 下，進行濃度 500 ppm 之乙烯催熟 24 小時，再放置於 25°C 使其後熟。

1. *Mh-ACO2* 默化轉殖香蕉之果實自然後熟情形

(1) 自然後熟之香蕉果皮轉色程度

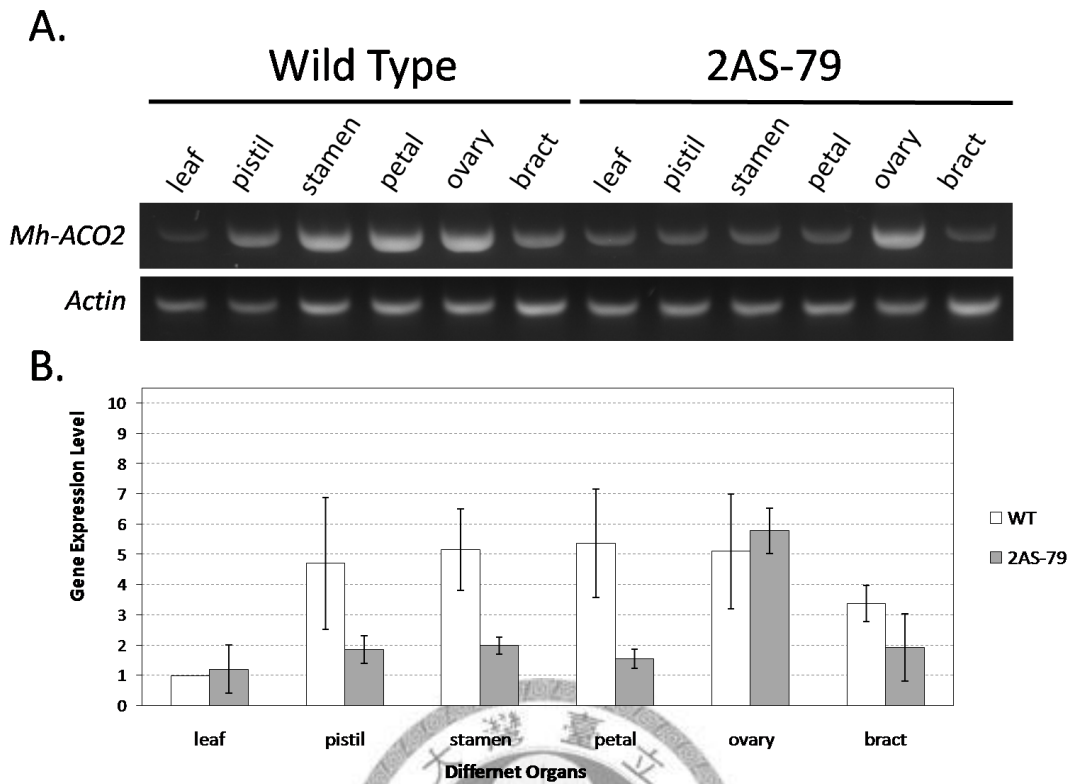
利用果皮轉色的程度，將香蕉果實後熟情形分成八級的果色指數 (圖十六)，第 1 級為全綠，第 2 級為綠色帶極微黃，第 3 級為綠色多於黃色，第 4 級為黃色多於綠色，第 5 級為兩端綠，第 6 級為全黃，第 7 級為生理斑點出現，第 8 級為斑點擴大。

其中在自然後熟處理下，可發現未轉殖對照株之果實，在約 5 天之後，



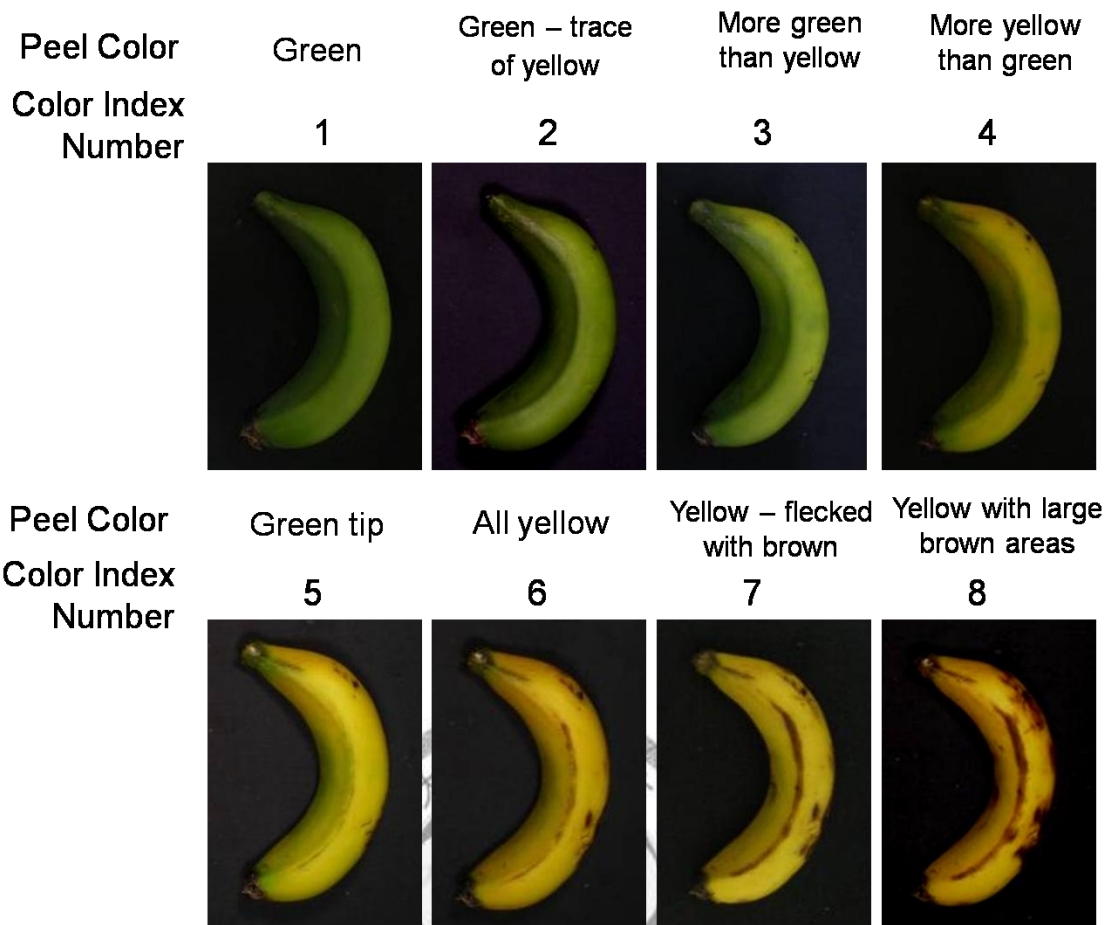
圖十四、*Mh-ACO1* 基因於默化 *Mh-MAO2* 香蕉 (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group) 轉殖系 2AS-79 之不同器官表現量

Fig. 14. Differential accumulation of *Mh-ACO1* gene in different organs of the *Mh-ACO2* gene silencing transgenic banana lines 2AS-79 (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group). A. RT-PCR electrophoresis map of *Mh-ACO1* expression in different organs. B. *Mh-ACO1* expression vertical bar chart. WT, non-transformed control. 2AS-79, transgenic *Mh-ACO2* silenced transgenic banana line 2AS-79. Bars indicate the expression levels in different organs relative to the leaf in wild type.



圖十五、*Mh-ACO2* 基因於默化 *Mh-MAO2* 香蕉 (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group) 轉殖系 2AS-79 之不同器官表現量

Fig. 15. Differential accumulation of *Mh-ACO2* gene in different organs of the *Mh-ACO2* gene silencing transgenic banana lines 2AS-79 (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group). A. RT-PCR electrophoresis map of *Mh-ACO2* expression in different organs. B. *Mh-ACO2* expression vertical bar chart. WT, non-transformed control. 2AS-79, transgenic *Mh-ACO2* silenced transgenic banana line 2AS-79. Bars indicate the expression levels in different organs relative to the leaf in wild type.



圖十六、香蕉 (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group) 後熟之果皮顏色指數

Fig. 16. Standard color index numbers for banana (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group) ripening. (Modified from Csiro, 1972)

即開始有緩慢之轉色情形 (圖十七)，在約第 15 天到達第 3 級，並在大約第 20 天之後，到達第 4 級，在第 28 天到達第 5 級，於第 32 天到達第 6 級，第 35 天到達第 7 級，第 37 天到達第 8 級。而 *Mh-ACO2* 默化轉植株香蕉果色轉色情形，與未轉殖對照香蕉果實相比，後熟表現明顯延緩 (圖十七)，轉植株果皮在第 6 天後開始有緩慢轉色，在約第 20 天時，達到第 3 級，並於第 3 級與第 4 級之間，維持了約 20 天，直到第 40 天後才進入第 4 級，並在第 43 天達到第 5 級。

(2) 自然後熟之香蕉果實呼吸率

利用 GC 測定自然後熟果實的二氧化碳產生量，以推算後熟果實之呼吸率。結果顯示 (圖十八)，在第 17 天前，未轉殖對照香蕉與轉殖香蕉果實的呼吸率，均呈現低量穩定的表現，二者間無明顯差異，到第 18 天後，未轉殖對照果實呼吸率約 $0.03 \text{ ml CO}_2/\text{g/hr}$ 開始上升，直至第 27 天到達呼吸高峰 $0.05 \text{ ml CO}_2/\text{g/hr}$ ，然後開始下降。而轉植株果實到試驗最後測定日期之第 32 天，依然持續維持著低量的穩定表現。

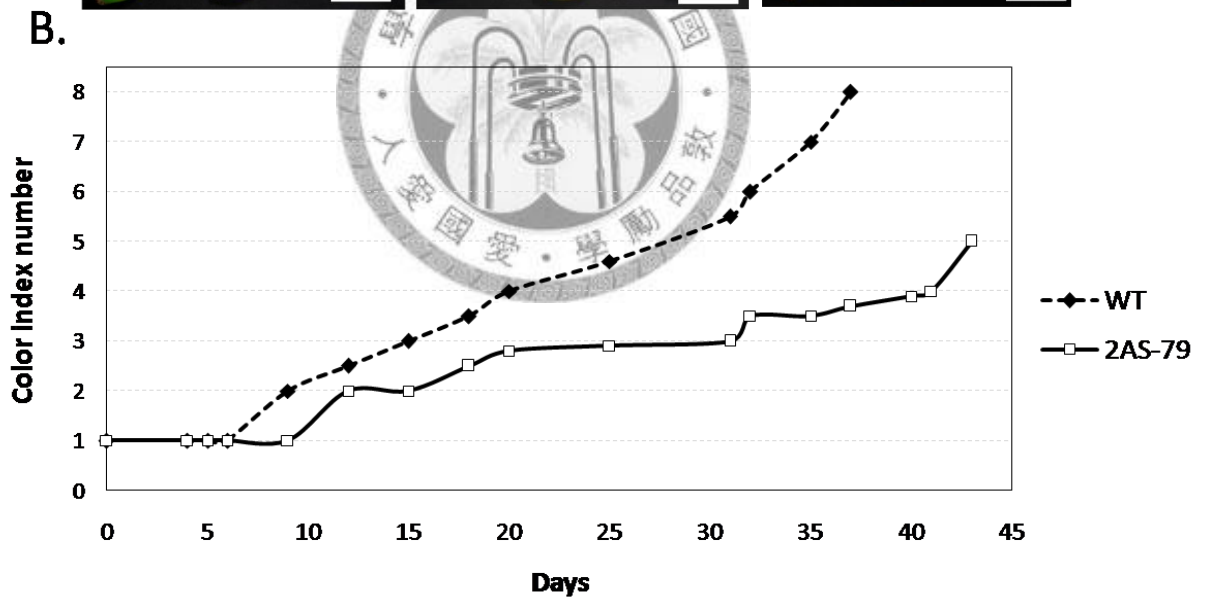
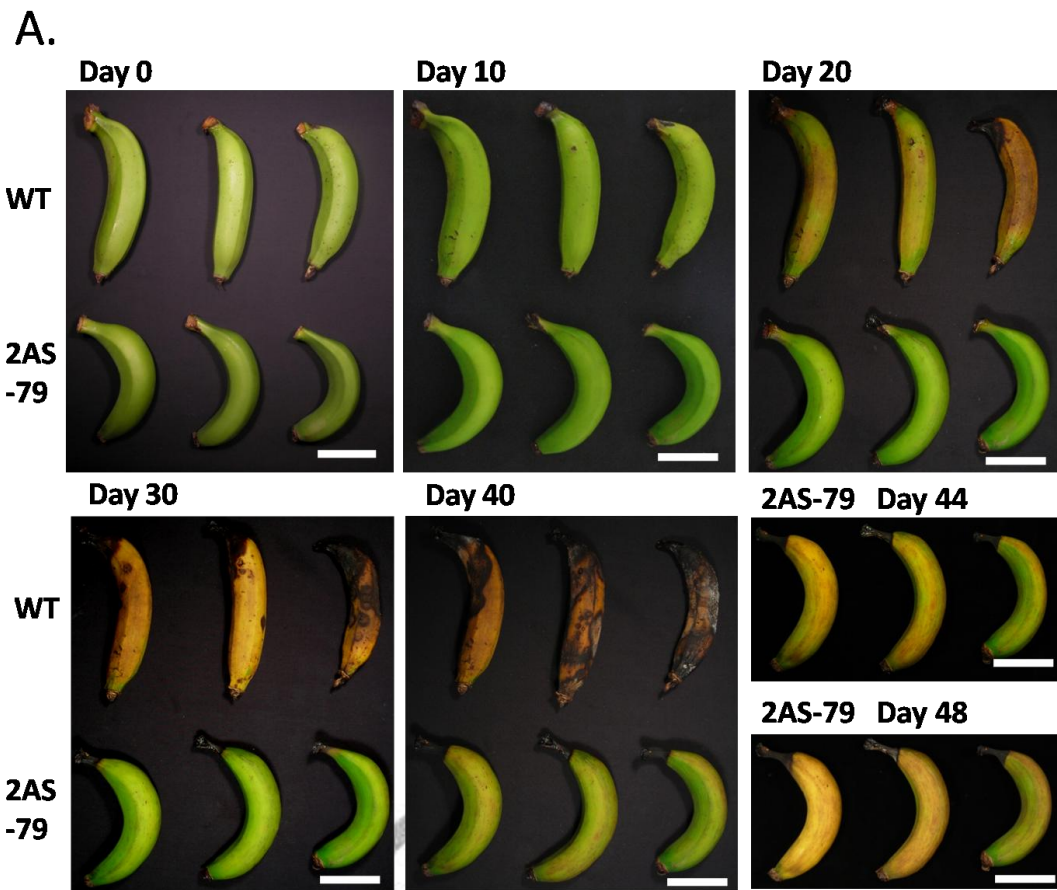
(3) 自然後熟之香蕉果實乙烯生成量

利用 GC 測定自然後熟果實的乙烯產生量。結果顯示 (圖十九)，在第 20 天前，未轉殖對照香蕉與轉殖香蕉果實的乙烯生成量，均呈現極低量穩定的表現，且二者間的表現沒有差異。在第 20 天後，未轉殖對照株開始大量生成乙烯，在約 27 天到達乙烯生成高峰，約 $1.7 \mu\text{l C}_2\text{H}_4/\text{g/hr}$ ，之後則快速下降。而轉植株依然呈現極低量的表現情形，僅在約 30 天左右，有約 $0.2 \mu\text{l C}_2\text{H}_4/\text{g/hr}$ 的少量乙烯表現被偵測到。

2. *Mh-ACO2* 默化轉殖香蕉之果實催熟情形

(1) 催熟之香蕉果皮轉色程度

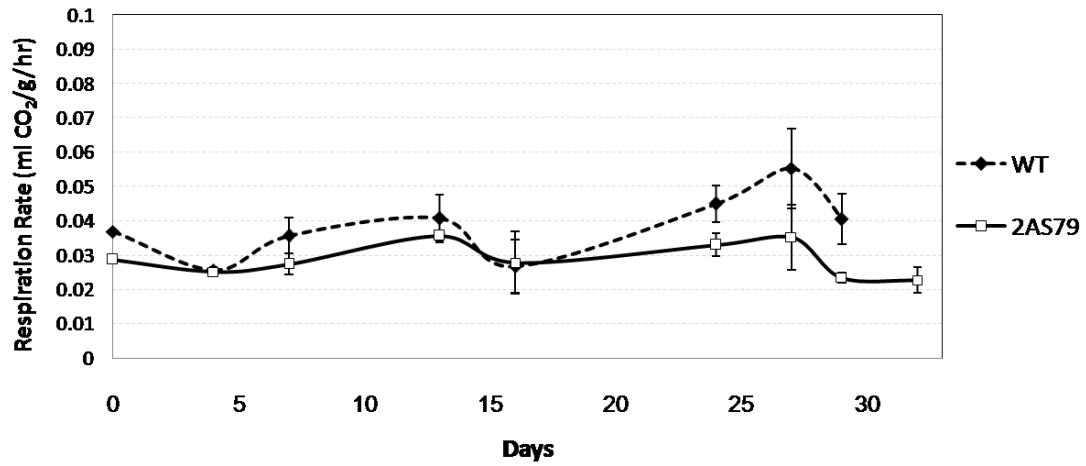
香蕉果實利用 500 ppm 之乙烯進行催熟，並以催熟前為第 0 天，催熟



圖十七、*Mh-ACO2* 基因默化之北蕉 (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group) 果實後熟果皮轉色情形

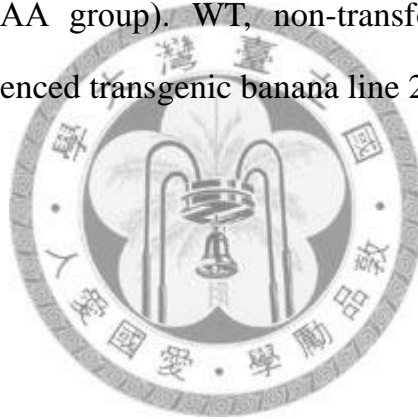
Fig. 17. Changes in peel color during ripening of *Mh-ACO2* silenced transgenic banana (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group). WT, non-transformed control. 2AS-79, transgenic *Mh-ACO2* silenced transgenic line 2AS-79. A. Changes in peel color during ripening of banana fruits. B. Changes pattern in peel color during ripening of banana fruits. Bars = 5 cm.

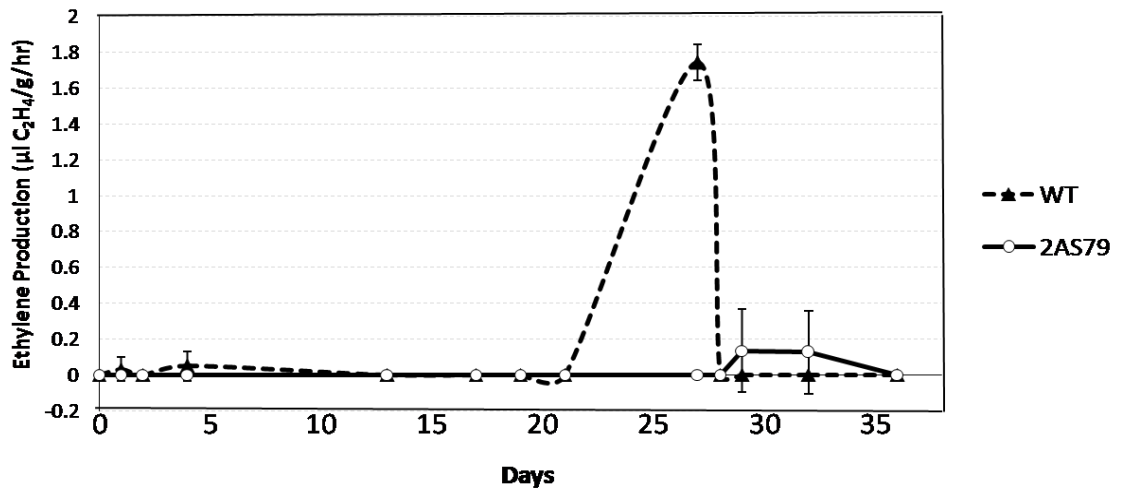




圖十八、*Mh-ACO2* 基因默化之北蕉(*Musa* 'Pei Chiao', AAA group) 果實後熟呼吸率變化

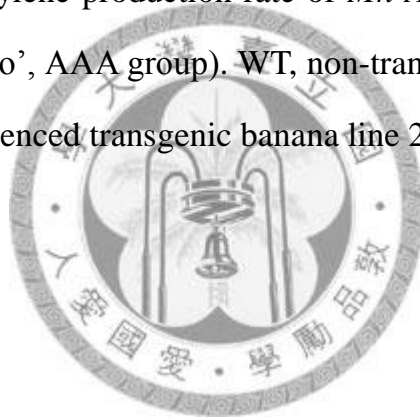
Fig. 18. Changes in respiration rate of *Mh-ACO2* silenced transgenic banana (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group). WT, non-transformed control. 2AS-79, transgenic *Mh-ACO2* silenced transgenic banana line 2AS-79.





圖十九、*Mh-ACO2* 基因默化之北蕉 (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group) 果實後熟乙烯生量變化

Fig. 19. Changes in ethylene production rate of *Mh-ACO2* silenced transgenic banana (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group). WT, non-transformed control. 2AS-79, transgenic *Mh-ACO2* silenced transgenic banana line 2AS-79.



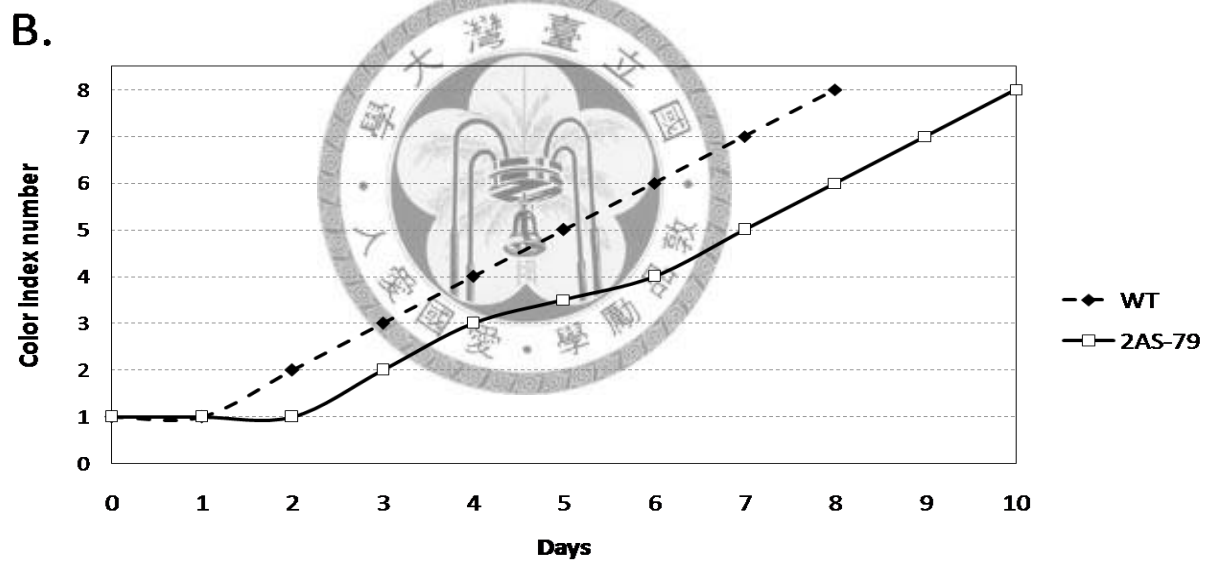
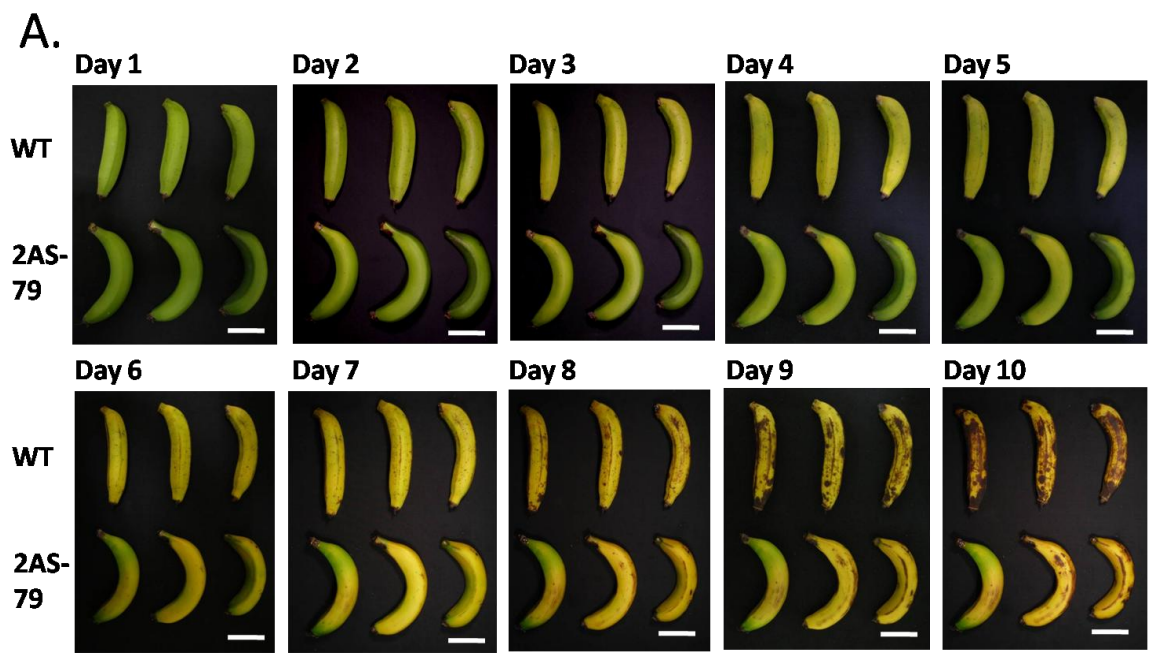
後為第 1 天當作基準。結果指出 (圖二十), 經過催熟後之對照株香蕉果實, 在催熟後第一天, 即開始以一天一個等級向上升, 於第 8 天到達第 8 級。而轉殖株果實在第 2 天才開始轉色, 第 3 天到達第 2 級, 第 4 天到達第 3 級, 之後轉色情形稍微延緩, 至第 6 天才到達第 4 級, 之後以一天上升一級的速度, 直至第 10 天到達第 8 級。

(2) 催熟之香蕉果實呼吸率

利用 GC 測定催熟後果實的二氧化碳產生量, 以推算後熟果實之呼吸率。結果顯示 (圖二十一), 在催熟後第 1 天, 未轉殖對照株果實的呼吸率, 即立即上升到第 2 天到達表現高峰, 並維持穩定之高呼吸率表現, 約維持在 $0.13 \text{ ml CO}_2/\text{g/hr}$, 到第 5 天開始下降, 而在第 6 天後呼吸率又再度上升。轉殖株的呼吸率表現, 在催熟第 1 天, 同樣的呼吸率有急速上升, 上升至 $0.075 \text{ ml CO}_2/\text{g/hr}$ 後, 在第 2 天隨即就降了下來, 之後持續維持在約 $0.04 \text{ ml CO}_2/\text{g/hr}$ 的低呼吸率表現, 直至第 6 天後才開始急速上升, 到第 8 天到達呼吸高峰 $0.11 \text{ ml CO}_2/\text{g/hr}$, 之後則開始下降, 在第 10 天後則又開始再度上升。

(3) 催熟之香蕉果實乙烯生成量

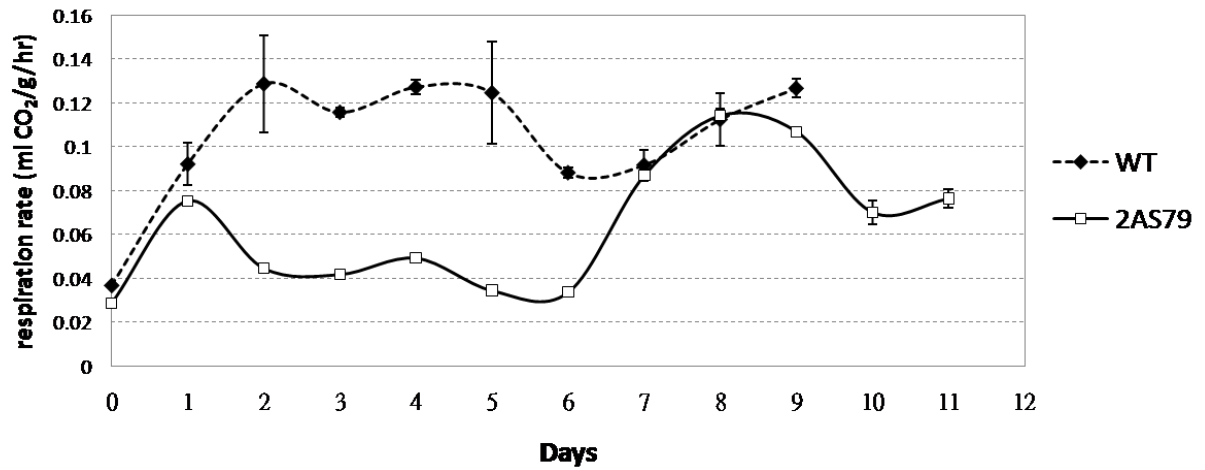
利用 GC 測定催熟處理後, 後熟果實的乙烯產生量。結果顯示 (圖二十二), 未轉殖之對照株香蕉, 在催熟處理第 1 天後, 乙烯生成量即急速上升, 在第 2 天到達約 $3 \mu\text{l C}_2\text{H}_4/\text{g/hr}$ 後, 維持表現約到第 6 天後, 開始再度上升, 至約第 7 天到達乙烯生成量高峰 $5.2 \mu\text{l C}_2\text{H}_4/\text{g/hr}$, 隨後急速下降。而轉殖株香蕉, 在催熟後, 仍然維持著低於 $0.1 \mu\text{l C}_2\text{H}_4/\text{g/hr}$ 的表現, 直到第 3 天後才開始上升, 並在第 5 天到達乙烯生成量高峰 $3.1 \mu\text{l C}_2\text{H}_4/\text{g/hr}$, 之後則減緩緩慢下降, 並都維持在 $2-3 \mu\text{l C}_2\text{H}_4/\text{g/hr}$ 之間。



圖二十、*Mh-ACO2* 基因默化之北蕉 (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group) 果實催熟處理後之果皮轉色情形

Fig. 20. Changes in peel color during ripening of *Mh-ACO2* silenced transgenic banana (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group) after 24 hours treatment with 500 ppm C_2H_4 at 25°C. WT, non-transformed control. 2AS-79, transgenic *Mh-ACO2* silenced transgenic line 2AS-79. A. Changes in peel color during ripening of banana fruits. B. Changes pattern in peel color during ripening of banana fruits. Bars = 5 cm.

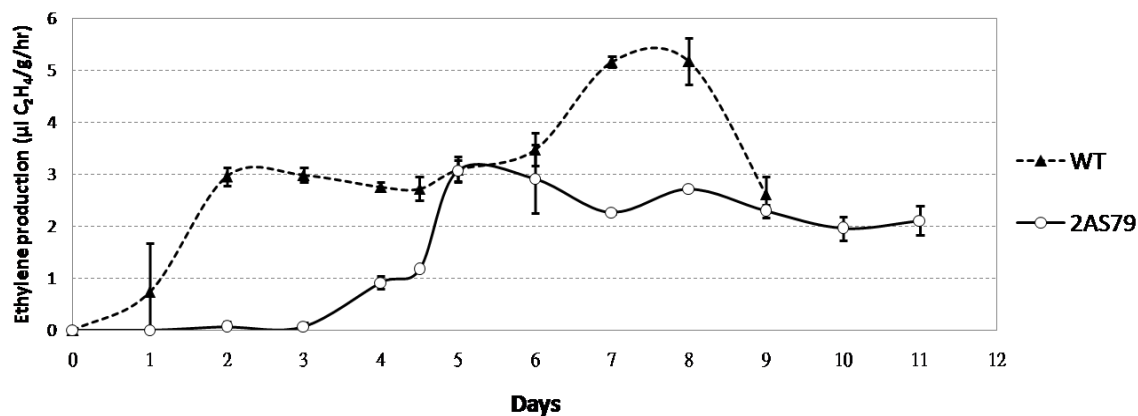




圖二十一、*Mh-ACO2* 基因默化之北蕉 (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group) 果實催熟處理之呼吸率變化

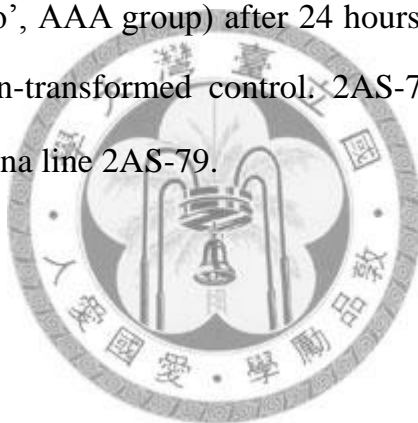
Fig. 21. Changes in respiration rate of *Mh-ACO2* silenced transgenic banana (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group) after 24 hours treatment with 500 ppm C₂H₄ at 25°C. WT, non-transformed control. 2AS-79, transgenic *Mh-ACO2* silenced transgenic banana line 2AS-79.





圖二十二、*Mh-ACO2* 基因默化之北蕉 (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group) 果實後熟乙烯生量變化

Fig. 22. Changes in ethylene production rate of *Mh-ACO2* silenced transgenic banana (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group) after 24 hours treatment with 500 ppm C₂H₄ at 25°C. WT, non-transformed control; 2AS-79, transgenic *Mh-ACO2* silenced transgenic banana line 2AS-79.



(八) ACC 氧化酶基因於 *Mh-ACO2* 默化轉殖香蕉果皮與果肉之表現

利用 RT-PCR 觀察 *Mh-ACO2* 默化轉殖株 2AS-79 中，*Mh-ACO1* 與 *Mh-ACO2* 在後熟果皮及果肉中之表現情形。以 500 ppm 乙烯催熟後之 *Mh-ACO2* 默化轉殖香蕉果實，依照果皮顏色指數區分後熟階段，以第 1、4 和 7 級的後熟果實，分別針對果皮以及果肉進行觀察。

1. ACC 氧化酶基因於 *Mh-ACO2* 默化轉殖香蕉果皮之表現

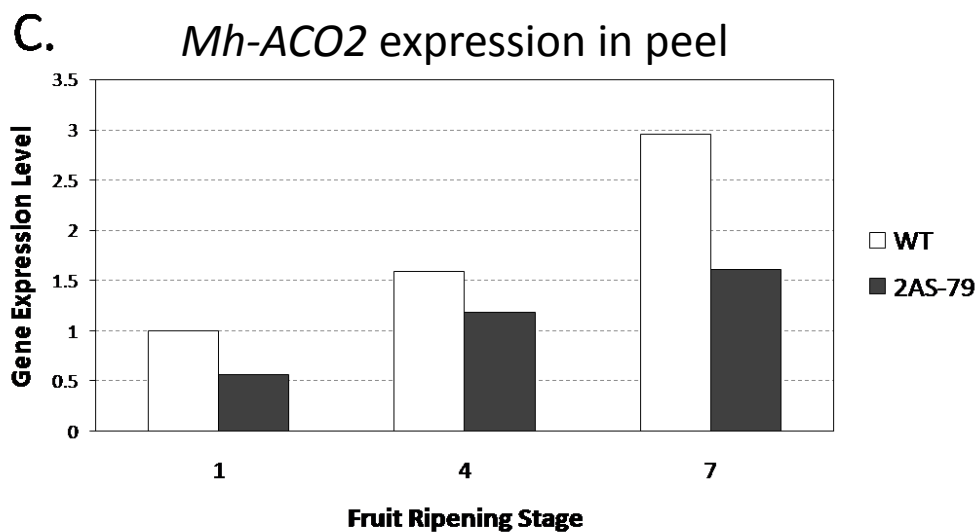
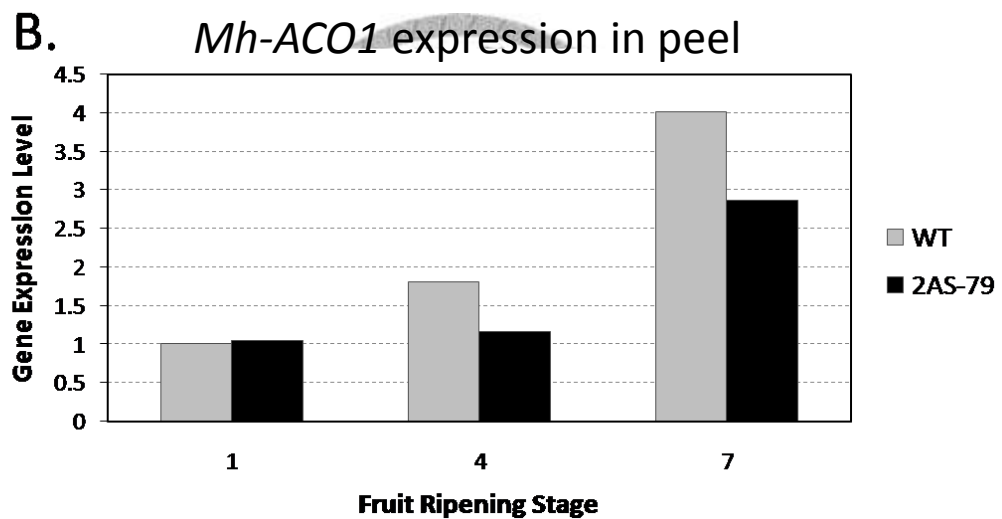
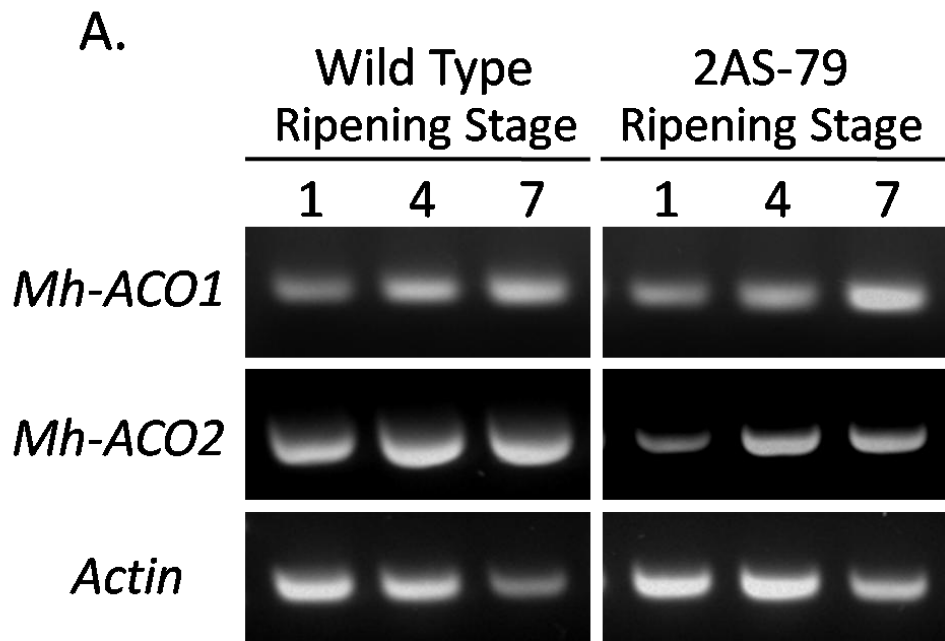
觀察結果顯示，*Mh-ACO1* 在未轉殖對照株與默化 *Mh-ACO2* 轉殖株之果皮中 (圖二十三 A 和 B)，於後熟第一級時，*Mh-ACO1* 在兩者間表現量相似，而在第 4 級的時候，未轉殖對照株的 *Mh-ACO1* 表現量則高於轉殖株，表現量約為轉殖株的 1.6 倍，當進入第 7 級之後，未轉殖對照株的 *Mh-ACO1* 大量表現，轉殖株中的 *Mh-ACO1* 也呈現大量增加，但轉殖株中的表現量，仍然只有未轉殖對照株的 7 成。

而 *Mh-ACO2* 在果皮的表現情形上 (圖二十三 A 和 C)，在後熟第 1 級時，*Mh-ACO2* 的表現量僅為未轉殖對照株的 5 成，在進入第 4 級後，在未轉殖對照株與轉殖株間的表現量差異則變小，*Mh-ACO2* 在未轉殖對照株的表現量僅為轉殖株的 1.3 倍，但當進入第 7 級後，兩者的表現量差距又拉大，*Mh-ACO2* 在未轉殖對照株的表現量為轉殖株的 1.8 倍。

2. ACC 氧化酶基因於 *Mh-ACO2* 默化轉殖香蕉果肉之表現

觀察結果顯示，*Mh-ACO2* 在未轉殖對照株與默化 *Mh-ACO2* 轉殖株之果肉中 (圖二十四 A 和 B)，於後熟第一級時，*Mh-ACO2* 在兩者間表現量均呈現低量表現，而在第 4 級的時候，未轉殖對照株的 *Mh-ACO1* 表現量則高於轉殖株，表現量約為轉殖株的 1.5 倍，當進入第 7 級之後，*Mh-ACO2* 基因表現無明顯增加，未轉殖對照株則高於轉殖株約 1.3 倍。

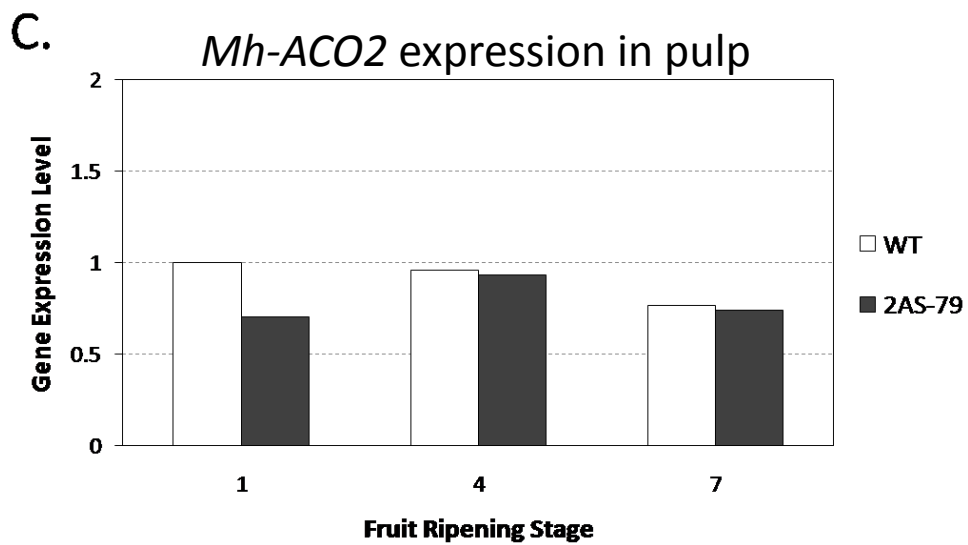
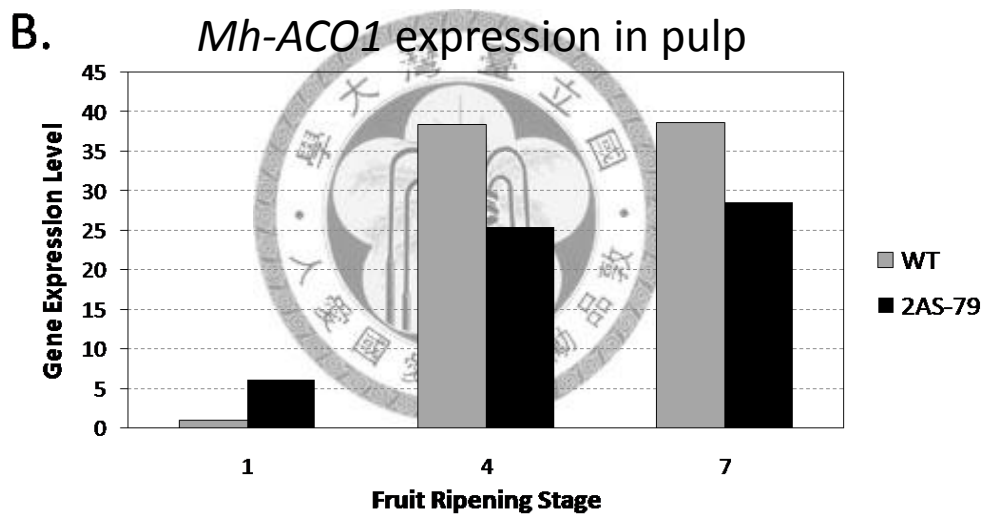
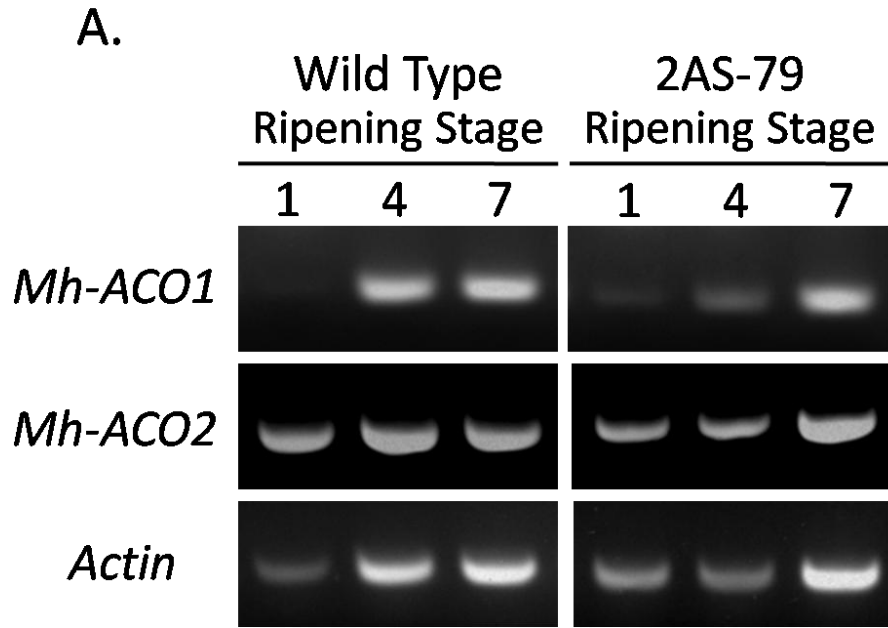
而 *Mh-ACO2* 在果皮的表現情形 (圖二十四 A 和 C)，在後熟第 1 級時，*Mh-ACO2* 的表現量僅為未轉殖對照株的 7 成，而在第 4 級與第 7 級時，未轉殖對照株與轉殖株相比，*Mh-ACO2* 的表現量均無明顯差異。



圖二十三、ACC 氧化酶基因於默化 *Mh-ACO2* 轉殖香蕉 2AS-79 (*Musa* ‘Pei Chiao’, AAA group) 果皮中之表現

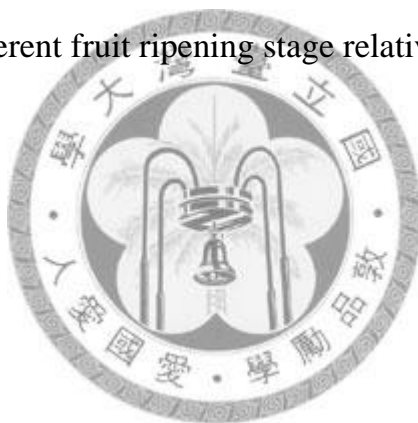
Fig. 23. ACC oxidase gene expression of *Mh-ACO2* silenced transgenic banana (*Musa* ‘Pei Chiao’, AAA group) line 2AS-79 peel. A. RT-PCR electrophoresis map of *Mh-ACO1* and *Mh-ACO2* expression. B. *Mh-ACO1* expression vertical bar chart. C. *Mh-ACO2* expression vertical bar chart. Total RNA were extracted from peels of banana fruits after 24 hours treatment with 500 ppm C₂H₄ at 25°C. WT, non-transformed control. 2AS-79, transgenic *Mh-ACO2* silenced transgenic banana line 2AS-79. Bars indicate the expression levels in different fruit ripening stage relative to the stage 1 in WT.





圖二十四、ACC 氧化酶基因於默化 *Mh-ACO2* 轉殖香蕉 2AS-79 (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group) 果肉中之表現

Fig. 24. ACC oxidase genes expression of *Mh-ACO2* silenced transgenic banana (*Musa* 'Pei Chiao', AAA group) line 2AS-79 pulp. A. RT-PCR electrophoresis map of *Mh-ACO1* and *Mh-ACO2* expression. B. *Mh-ACO1* expression vertical bar chart (each line folded to stage 1 in WT). C. *Mh-ACO2* expression vertical bar chart (each line folded to stage 1 in WT). Total RNA were extracted from pulps of banana fruits after 24 hours treatment with 500 ppm C_2H_4 at 25 °C . WT, non-transformed control. 2AS-79, transgenic *Mh-ACO2* silenced transgenic banana line 2AS-79. Bars indicate the expression levels in different fruit ripening stage relative to the stage 1 in WT.



伍、討論

一、香蕉 *Mh-ACO1* 基因默化轉殖

(一) 北蕉細胞篩選抗性

本論文用以進行轉殖之默化 *Mh-ACO1* 基因表現載體為 pBI121-1AnS，此類 pBI121 載體上含有由 NOS 啟動子調控之 *nptII* 植物篩選基因，對 kanamycin、G418、neomycin 及 paromomycin 等抗生素具有抗性。香蕉轉殖系統中篩選基因的選擇，若考量實用之安全性，*nptII* 應為較適當之選擇，因為其基因產物在研究報告中顯示，不會對人體有害 (Fuchs et al., 1993)。香蕉轉殖系統中，若選擇 *nptII* 為篩選基因，配合選用 G418 抗生素為篩選試劑，可有較高的篩選效率 (徐, 1995)。本試驗經過農桿菌媒介法轉殖後之北蕉細胞，分別以濃度 25 mg/L 或 50 mg/L 的 G418 抗生素進行篩選，結果顯示，在篩選濃度為 50 mg/L 下，細胞在兩週內即迅速呈現黑褐色死亡狀態，且無任何擬胚發生，而在濃度 25 mg/L 下篩選四週後，可發現大部分細胞呈現黑褐色死亡狀態，而其中有數十顆擬胚的發生。由此結果顯示，25 mg/L 的 G418 為經過農桿菌媒介法處理後之北蕉細胞較適當的篩選濃度。徐 (1995) 針對香蕉細胞對於 kanamycin、G418 及 hygromycin 等抗生素的天然抗性進行測試，結果指出 40 mg/L 的 G418 抗生素為經過 60 目不鏽鋼網過濾後之北蕉細胞適當的篩選濃度，而 60 目以下的細胞在 20 mg/L 的 G418 下，細胞生長明顯受到抑制；此結果與本試驗結果有所差異，推測因為北蕉細胞遭受到試驗處理步驟，以及農桿菌感染等處理，細胞本身已遭受到傷害逆境，導致細胞活性及健康狀態的降低，因此在之後的篩選繼續施以較高濃度的抗生素，容易導致細胞的死亡。因此本試驗採取，前 4 週先以略高於會導致細胞生長受抑制的 20 mg/L 濃度的 25 mg/L G418 進行篩選，待細胞健康狀態穩定後，再移至較高濃度的 50 mg/L G418 進行篩選。

(二) 北蕉細胞的生長分化

黃 (1994) 以 Robusta (*Musa* spp., 'Robusta', AAA group) 細胞培養於 SH 培養基上，結果指出 60 目以下的細胞大約在 20 天後形成胚狀體，並在培養至 30 至 40 天可以形成具有明顯胚形的白色小胚。李 (2006) 以北蕉細胞培養於 SH 培養基上，結果顯示，培養 6 週後可觀察到體胚逐漸形成，並由透明狀態轉變成不透明之白色，大小約為 0.1 cm。本試驗經過農桿菌媒介法轉殖後之北蕉細胞，培養於 SH 培養基，於 2 週後有擬胚的出現，培養 4 週後有白色的小胚形成，培養約三個月後可發現有初期的根狀體構造形成，細胞生長分化時程與黃 (1994) 與李 (2006) 之結果相似。

二、香蕉 *Mh-ACO2* 基因默化轉殖株分析

(一) 轉殖片段於香蕉基因組中的插入情形

利用農桿菌媒介法進行北蕉材料轉殖，轉殖方式為將外來基因先行構築於 T-DNA 之質體中，再導入含有功能性致毒區域但缺少 T-DNA 的 Ti 質體之農桿菌中，再利用農桿菌農感菌中的 vir 蛋白將 T-DNA 轉移進入植物細胞中，並插入植物基因組內，以達到轉殖外來基因的功能 (An et al., 1985; Bevan, 1984)。本試驗經過農桿菌媒介法後，利用南方氏雜交分析，觀察轉殖片段於香蕉基因組中插入情形，結果顯示，依照插入位置的差異，可將轉殖株分為三群，轉殖株編號 2AS-6 及 2AS-80 為一群，編號 2AS-1、2AS-49 及 2AS-79 為第二群，編號 2AS-33、2AS-82 及 2AS-87 為第三群，已為穩定之轉殖並且所有轉殖株均為多拷貝的插入。而多拷貝的轉殖插入，可以提高插入的基因表現作用 (Allen et al., 1996)，但過多拷貝的插入是否會導致北蕉植株的生長與生理變化，則需再更進一步的觀察。

(二) *Mh-ACO2* 基因默化轉殖香蕉生長情形

轉殖默化 *Mh-ACO2* 表現載體 pBI121-2AnS 之北蕉，在組織培養期間、定植後，直到株高約 1.5 公尺前，株高生長狀況與未轉殖對照株無明顯差異。但繼續栽培 5 個月後，未轉殖對照株生長至株高 3 公尺以上，但轉殖株株高均僅約 2.5 公尺，轉殖株除了株高較低之外，在栽培過程，也發現到轉殖株較容易發生如黃葉病 (Panama disease) 或是黑星病 (leaf freckle) 等真菌型病害，另外也發現有的植株有莖基部腐爛而倒塌死亡之現象。在過去的研究中指出，乙烯產生或乙烯訊息傳導受到阻礙的轉殖或突變株 (Klee et al., 1991; Knoester et al., 1998)，會導致植物原本具有的一般性抵抗能力降低，如對一些非生物性的逆境、土壤性真菌的逆境等 (Knoester et al., 1998; Geraats et al., 2002; Geraats et al., 2003)，當此類植物生長在一般土壤中，植株會漸漸的開始枯萎，並在植物地際部之部位逐漸產生壞疽，進而導致莖的腐爛使得植物倒塌。這些徵狀可歸因於病原菌 rot-causing oomycetous *Pythium* 所導致的自發性感染以及根部感染性真菌如 *Chalara elegans*、*Fusarium oxysporum*、*Fusarium solani* 和 *Rhizopus stolonifer* 等所造成，這些菌存在於一般的盆栽土壤中，但此些微生物並不會危害那些乙烯產生或訊息傳遞路徑正常的植物 (van Loon et al., 2006)。由此些結果推測，*Mh-ACO2* 表現默化的轉殖香蕉，在生長初期與未轉殖對照株生長勢沒有差異，但在後期的生長勢變慢，有可能因為栽培時間的拉長，導致無土栽培介質中的真菌數增加，而導致轉殖株生長受到影響，如要進一步證明，需再進一步進行轉殖株之感病性試驗。

(三) 不同轉殖株系間 *Mh-ACO2* 基因默化情形

利用 RT-PCR 檢測不同轉殖株間 *Mh-ACO2* 表現情形，以新葉組織材料總 RNA 進行試驗。依照默化 *Mh-ACO2* 基因的程度，可約略分為三群，第一群為默化效果大於 80 % 以上的：2AS-6、2AS-78、2AS-80 及 2AS-82，第二群為默化效果介於 50 % 至 80 % 的：2AS-1 及 2AS-79，第三群為默化

效果小於 50 % 的：2AS-87。此默化程度的分群結果，可與 RNAi 構築片段插入香蕉基因組中的差異性分群相呼應，其中 2AS-6 與 2AS-80 為同一群，2AS-1 與 2AS-79 為同一群，由此結果推測不同轉殖株系間的默化效果差異性，有可能因為轉殖片段插入的位置與拷貝數差異所致，然而此原因仍然不能解釋轉殖株系間差異的表現，其中在南方氏雜交分析的結果 2AS-82 與 2AS-87 是歸類於同一群，但是在默化效果上，兩轉殖系的表現情形則不同，故猜測仍有其他因子影響 RNAi 作用的默化效果。Xiong 等 (2005) 利用 RNAi 干擾技術，默化番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill) 的 ACC 氧化酶基因，其結果依照 ACC 氧化酶基因及蛋白、乙烯生成及果實後熟程度在轉殖番茄中的表現，將 RNAi 的表現作用分成三個程度，分別為 non-RNAi、semi-RNAi 及 full-RNAi，並推測造成的原因可能是 RNAi 構築時所使用的 linker 長短之差異、所使用的啟動子在植物基因組中的表現，或是植物體本身對 RNAi 的部分抗性 (Chuang and Meyerowitz 2000; Fire 1999) 所導致。

(四) siRNA 於轉殖株中之表現情形

利用 RNA 干擾技術，默化目標基因，會產生 21 至 27 nt 大小的 siRNA，可利用北方雜交分析檢測此些小片段 RNA 的表現，以確認 RNA 干擾表現情形。在 2AS-79 轉殖株的花部器官中，可以在花瓣部位，檢測到 siRNA 之表現，片段大小約為 25–27 nt，然而在雄蕊、雌蕊、子房及苞片組織，則未檢測到明顯 siRNA 表現。同時，利用 RT-PCR 觀察此些器官的 *Mh-ACO2* 默化效果，結果顯示，在花瓣中的默化效果最為明顯，其他部位的默化效果則較低，此結果與 siRNA 的表現量相符合，同時也由此可知，siRNA 生成量越多、RNAi 作用越明顯的部位，目標基因默化的效果也較為明顯。

不同器官間的表現結果，也同時指出 RNAi 的作用與 siRNA 的產生量，具有組織器官間的差異表現。RNAi 作用機制中，雙股 RNA 會被 Dicer

所辨識，而將雙股 RNA 切成 21 至 27 片段大小的 siRNA (Matzke et al., 2001; Waterhouse et al., 2001)。阿拉伯芥中的 Dicer 目前發現有四種，分別為 DCL1、DCL2、DCL3 及 DCL4，此四種 Dicer 的表現也具有位置及功能性的差異，*DCL1* 基因會表現在頂端分生組織 (apical meristems)、花芽分生組織 (floral meristem)、花部器官、莖生葉 (cauline leaf) 及莖 (Jacobsen et al., 1999)。而 *DCL2* 基因會在花序 (inflorescence) 上表現，但在葉片中則無 (Meins et al., 2005)。*DCL3* 基因與 *DCL2* 基因相似，都會在花序上表現，而在葉片中則未見 (Meins et al., 2005)。由此推測，在香蕉中的 RNAi 作用效果，會有組織器官間的表現差異，可能與 Dicer 的作用有所相關。

(五) ACC 氧化酶基因於創傷逆境下之表現

在植物中乙烯會受到創傷逆境的誘導而產生。香蕉葉片在創傷逆境下，不論對照株或轉殖株，*Mh-ACO1* 均會被誘導表現，並在 12 小時達到表現高峰，且對照株與默化 *Mh-ACO2* 轉殖株的 *Mh-ACO1* 表現量，無明顯差異。而在 *Mh-ACO2* 表現上，在對照株與轉殖株中，均呈現低量且持平的穩定表現，而轉殖株中的 *Mh-ACO2* 表現量均低於對照株。此結果可得知，在對於創傷逆境下的乙烯生成，主要由 *Mh-ACO1* 基因所負責，並且當 *Mh-ACO2* 基因被默化的情況下，並不會影響 *Mh-ACO1* 基因的表現情形。李 (2006) 應用轉殖阿拉伯芥分析 *Mh-ACO1* 及 *Mh-ACO2* 啟動子的活性表現，結果指出，在機械傷害的創傷處理下，*Mh-ACO1* 啟動子為被誘導表現，*Mh-ACO2* 而則否，此結果與香蕉葉片創傷試驗結果相符。

(六) *Mh-ACO2* 默化轉殖香蕉延緩果實後熟之情形

一般市售之香蕉，會在第 1 級的青熟狀態時進行採收並儲運，再經由催熟處理轉色至第 4 級時移出販售 (柯, 1987)。將默化 *Mh-ACO2* 轉殖香蕉果實，擺置於 25°C 下進行自然後熟，利用果皮轉色的程度，將香蕉果實後熟情形分成八級的果色指數進行觀察。結果顯示，轉殖株果實相較於未轉

殖對照株，後熟到達第 4 級時，轉殖株果實延緩了約 20 天，後熟到達第 5 級時，轉殖株果實延緩後熟了約 15 天。此外，觀察自然後熟時香蕉果實的呼吸率跟乙烯生成量，未轉殖對照株果實的呼吸率表現高峰跟乙烯生成高峰，表現時期約在後熟達到約第 4 級到第 5 級之間，並且呼吸率與乙烯生成量在產生高峰的表現天數上，都較轉殖株果實來的早。此結果證實，利用 RNA 干擾技術，默化香蕉 ACC 氧化酶基因 *Mh-ACO2* 的表現，以達到延緩果實後熟策略，是可行且成功的。

此外，將默化 *Mh-ACO2* 轉殖香蕉果實，於 25°C 下進行 500 ppm 之乙烯催熟處理，結果顯示，後熟到達第 4 級時，轉殖株果實較未轉殖對照株果實延緩了約 2 天，而呼吸率的表現，未轉殖對照株果實在第 2 級時，即有呼吸高峰，之後則略為下降，到了第 4 級時，則又有呼吸高峰的出現，此結果與柯 (1987) 將香蕉果實在 1000 ppm 乙烯處理後，於 25°C 下的表現趨勢相同。而轉殖株的呼吸率表現趨勢也相類似，但整體表現時間延遲了約 4 天。在乙烯的生成量表現上，催熟處理後的未轉殖對照株果實，在約第 2 至 3 級時達到一個乙烯生成高峰，此結果與柯 (1987) 將香蕉果實在 1000 ppm 乙烯處理後，表現趨勢相似，其在 16°C 下於第 3 級達到高峰，在 20°C 下提早於約 2.5 級時達到高峰。轉殖株果實的乙烯表現趨勢亦相同，在第 3 級時達到高峰，而整體表現時間延遲了約 3 天左右。由此些結果顯示，默化 *Mh-ACO2* 轉殖香蕉果實，再利用乙烯催熟的情況下，同樣可以達到快速後熟至可供市場銷售之第 4 級狀態，僅比未轉殖對照株果實延遲 2 天，由此可知，利用 RNA 干擾技術轉殖之 *Mh-ACO2* 轉殖香蕉，可以達到人為控制果實後熟之目的，以供市場銷售利用，並且在青熟階段的保存時間也較未轉殖對照株果實來的長，方便進行儲運以及產期調節之運用。

(七) ACC 氧化酶基因於果皮與果肉之表現

分別觀察 *Mh-ACO1* 與 *Mh-ACO2* 基因在果皮以及果肉之中，在第 1、

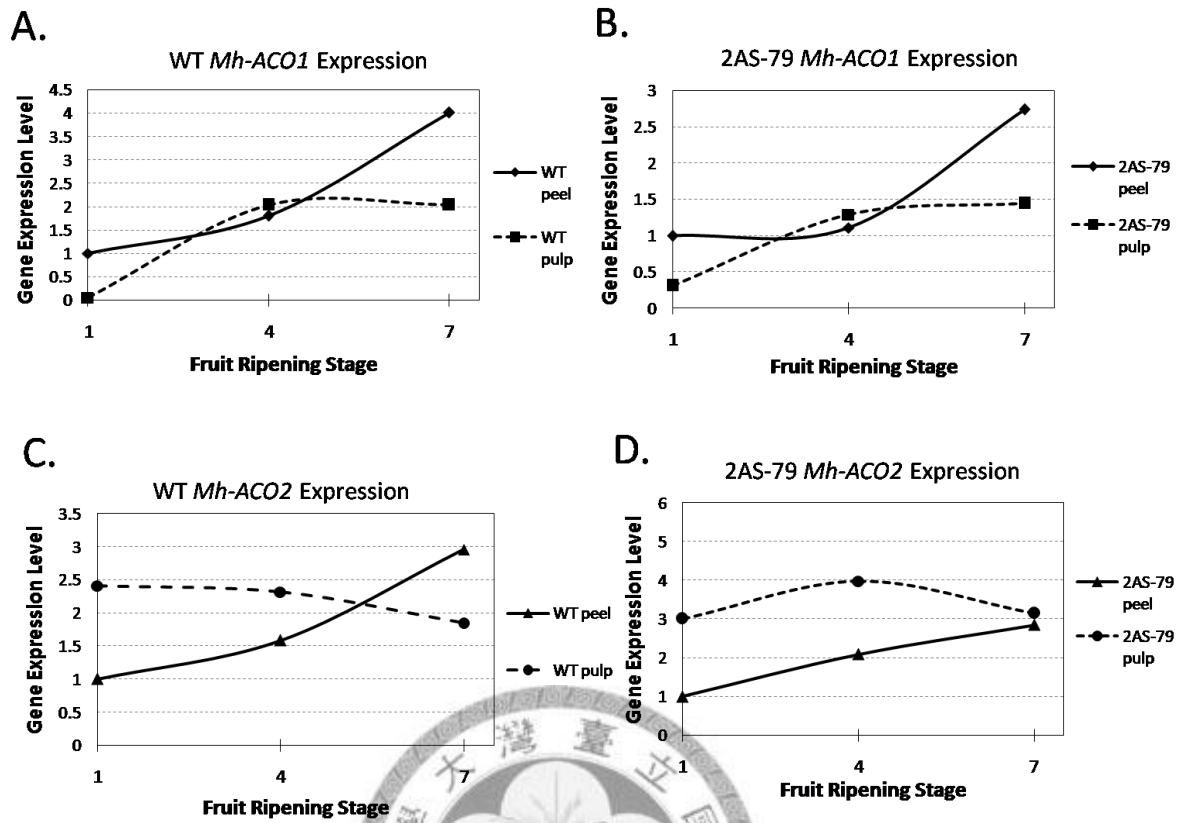
4 和 7 級等不同後熟時期的表現，以探討在果皮以及果肉中，*Mh-ACO1* 與 *Mh-ACO2* 之間是否有相互影響的關係，另外也期望了解在默化 *Mh-ACO2* 後，是否會導致在果皮以及果肉之間 *Mh-ACO1* 與 *Mh-ACO2* 表現趨勢的改變。

在未轉殖對照株果皮之中，不論 *Mh-ACO1* 或是 *Mh-ACO2* 基因，其表現量均會隨著後熟時期的增加而增加 (圖二十五 A 和 C)，而在轉殖株中，因為 *Mh-ACO2* 基因被默化，故 *Mh-ACO2* 在各個後熟階段表現量均較未轉殖株低，但是在隨著後熟時期的增加，其表現趨勢仍是增加的(圖二十五 D)，而 *Mh-ACO1* 在默化 *Mh-ACO2* 轉殖香蕉的果皮中，可觀察到在第 4 和 7 級時，表現量與未轉殖株相比是較低的(圖二十三 B)，由此結果可推測，在果皮之中 *Mh-ACO1* 基因的表現，會因為 *Mh-ACO2* 基因的默化，而有表現量較低的情形。另外，在未轉殖對照株與轉殖株的果肉當中，*Mh-ACO1* 基因在後熟第 1 級時，表現均非常微量，而在第 4 和 7 級時均大量表現，且無明顯隨後熟階段循序漸進提高的情形 (圖二十四 B)，而在 *Mh-ACO2* 默化轉殖株果肉中，*Mh-ACO1* 在第 4 和 7 級時的表現量，整體而言相較於未轉殖株是較低的。另外 *Mh-ACO2* 在果肉中的表現，不論未轉殖對照株與轉殖株之中，都是呈現低量的表現，且二者間無顯著性的差異(圖二十四 C)。由以上結果顯示 *Mh-ACO1* 基因在轉殖株的果皮或果肉中，在第 4 和 7 級時相對於未轉殖株表現量都是降低的情形，但是 *Mh-ACO2* 在轉殖株果皮中不論任何後熟階段都是降低的狀態，但是在果肉中，轉殖株與非轉殖株則沒有差異，由此結果可知 *Mh-ACO2* 基因的默化效果，在果皮以及果肉間是不同的，但 *Mh-ACO1* 不論在果皮或果肉中的表現，均會受到影響而表現量較低。

另外，單獨觀察 *Mh-ACO1* 基因在果皮以及果肉間的相對應表現趨勢，未轉殖株與轉殖株兩者的表現趨勢是相同的 (圖二十五 A 和 B)。雖然 *Mh-ACO1* 基因在轉殖株的果皮和果肉中呈現降低的情形，但並不影響其在果皮與果肉間的相對應趨勢。在後熟第 1 級時，果皮中的 *Mh-ACO1* 表現

量均大於果肉，在第 4 級時，果皮與果肉的 *Mh-ACO1* 表現量相似，但進入第七級後，果皮中的 *Mh-ACO1* 則大量的表現，而果肉中的則表現持平，表現量與第 4 級時相似（圖二十五 A 和 B）。而單獨觀察 *Mh-ACO2* 基因在果皮以及果肉間的相對應表現趨勢（圖二十五 C 和 D），在第 1 級時，果肉中的 *Mh-ACO2* 基因表現量是大於果皮的，在第 4 級時果肉中的表現量仍然高於果皮，但進入第 7 級時，未轉殖對照株果皮中的 *Mh-ACO2* 則大量增加，表現量並高於果肉，而在轉殖株中，果皮的 *Mh-ACO2* 基因則未如同非轉殖對照株一般大量提高，其表現量僅趨近於果肉中的 *Mh-ACO2* 表現。由以上結果可知，*Mh-ACO1* 在轉殖株與對照株中，果皮與果肉表現具有相同的趨勢，而 *Mh-ACO2* 在轉殖株與對照株中，果皮與果肉的表現趨勢在第 7 級時，而有不同的差異。

綜合以上說明可得到以下結論，*Mh-ACO1* 在後熟階段，在果皮與果肉中的表現量均呈現減少之情形，且 *Mh-ACO1* 在轉殖株與非轉殖株的果皮與果肉上，具有相同的表現趨勢。而 *Mh-ACO2* 在轉殖株果皮的表現量上是呈現減少之情形，但在果肉上則與對照株沒有差異，且轉殖株與非轉殖株在果皮與果肉中 *Mh-ACO2* 的具有不同的表現趨勢。在過去的研究中均指出，在果皮與果肉中 ACC 氧化酶的活性與基因表現量，均有不同的差異。ACC 氧化酶活性在果皮之中，會隨著後熟階段而被大量的活化，而在果肉中的活化狀態則非常低量（柯, 1987）。Inaba 等 (2007) 指出香蕉 (*Musa* 'Grand Nain', AAA group) 的 *MA-ACO1* 基因在果皮中會隨著成熟度增加而增加，在果肉中則呈現大量的穩定表現，並且經由丙烯及 1-甲基環丙烯組合的處理試驗推測，對於乙烯的生合成作用，果肉的部分屬於負向調控，而果皮中則是正向的調控 (Inaba et al., 2007)。由以上結果推測，在北蕉中，在香蕉中果皮及果肉表現上 ACC 氧化酶的表現差異，應主要為 *Mh-ACO2* 所造成，而非 *Mh-ACO1*。



圖二十五、ACC 氧化酶基因於默化 *Mh-ACO2* 轉殖香蕉 2AS-79 (*Musa* spp. cv. Pei Chiao, AAA group) 果皮和果肉中之趨勢

Fig. 25. ACC oxidase genes expression pattern in peel and pulp of *Mh-ACO2* silenced transgenic banana (*Musa* spp. 'Pei Chiao', AAA group) line 2AS-79. Lines indicate the expression levels in different ripening stage relative to the stage 1 in peel.

陸、結語

本研究利用 RNA 干擾技術默化香蕉 ACC 氧化酶基因，探討其在香蕉中扮演之角色。利用農桿菌媒介法轉殖默化 *Mh-ACO1* 表現載體進入香蕉中，經過篩選與培養，目前已取得已發根之體胚，待發芽之後，將利用葉片與根進行 GUS 活性組織化學染色分析確認擬轉殖株，進行轉殖株確認後，即可進行之後的分析。而默化 *Mh-ACO2* 之轉殖香蕉，已確認可有效延緩且可經由人為調控果實的後熟，但在轉殖株的抗病反應上，仍須進一步的研究。在果實後熟期間，*Mh-ACO1* 與 *Mh-ACO2* 在果皮與果肉間的表現是不同的，且 *Mh-ACO1* 因為 *Mh-ACO2* 遭到默化而表現量連帶的降低，而如要更進一步的探討兩者間在果實後熟中扮演之關係，則需再進一步比較默化 *Mh-ACO1* 之轉殖株，另外同時觀察 ACC 合成酶基因與乙烯訊息傳導相關基因的表現情形，以釐清香蕉果實後熟的乙烯作用機制。



柒、參考文獻

- 李盛新. 2006. 香蕉 ACC 氧化酶基因啟動子活性分析與默化質體之轉殖. 國立台灣大學園藝學研究所碩士論文.
- 林宜佑. 2004. 應用 RNA 干擾技術抑制香蕉 ACC 氧化酶基因表現之研究. 國立台灣大學園藝學研究所碩士論文.
- 周雅茵. 1996. 香蕉 ACC 氧化酶免疫組織定位之研究. 國立台灣大學園藝學研究所碩士論文.
- 柯立祥. 1987. 台灣香蕉採收後生理之研究. 國立台灣大學園藝學研究所博士論文.
- 馬溯軒. 1988. 香蕉之體胚發生與植株再生. 園藝作物組織培養之應用研討會專集. P. 181-188.
- 徐善德. 1995. 香蕉轉殖系統之建立及 ACC 合成酶反義基因之構築. 國立台灣大學園藝學研究所碩士論文.
- 黃怡菁. 1994. 香蕉細胞懸浮培養及原生質體培養體胚誘導研究. 國立台灣大學園藝學研究所博士論文.
- 張唐維. 1994. 香蕉乙烯形成酶 cDNA 之選殖及分析. 國立台灣大學園藝學研究所碩士論文.
- 劉育志. 1995. 香蕉 1-胺基環丙烷-1-羧酸合成酶及 1-胺基環丙烷-1-羧酸氧化酶抗體製備之研究. 國立台灣大學園藝學研究所碩士論文. 90p.
- 蔡德時. 1996. 香蕉 ACC 氧化酶基因之選殖及分析. 國立台灣大學園藝學研究所碩士論文.
- 賴信忠. 1997. 香蕉 ACC 氧化酶基因載體表達與純化及生化特性分析. 國立台灣大學園藝學研究所碩士論文.
- Abeles, F. B. 1973. Ethylene in plant biology. Academic Press London. 320.
- Aharoni, N., M. Lieberman and H. D. Sisler. 1979. Patterns of ethylene

- production in senescing leaves. *Plant Physiol.* 88:329-332.
- Allen, G. C., G. Hall Jr., S. Michalowski, W. Newman, S. Spiker, A. K. Weissinger and W. F. Thompson. 1996. High-level transgene expression in plant cells: effects of a strong scaffold attachment region from tobacco. *Plant Cell* 5:899-913.
- An, G., B. D. Watson, S. Stachel, M. P. Gordon and E. W. Nester. 1985. New cloning vehicles for transformation of higher plants. *EMBO J.* 4:277-284.
- Ayub, R. M. Guis, M. B. Amor, L. Gillot, J. P. Roustan, A. Latche, M. Bouzayen and J. C. Pech. 1996. Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. *Nat. Biotechnol.* 14:862-866.
- Barry, C. S., B. Blume, M. Bouzayen, W. Cooper, A. J. Hamilton and D. Grierson. 1996. Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato. *Plant J.* 9: 525-535.
- Becker, D. K., B. Dugdale, M. K. Smith, R. M. Harding, and J. L. Dale. 2000. Genetic transformation of Cavendish banana (*Musa* spp. AAA group) cv 'Grand Nain' via microprojectile bombardment. *Plant Cell Rep.* 19: 229-234.
- Bevan, M. 1984. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* 12:8711-8721.
- Bernstein, E., A. A. Caudy, S. M. Hammond, and G. J. Hannon. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature.* 409:363-366.
- Biale, J. B. 1960. Respiration of fruits. *Encycl. Plant Physiol.* 12:537-592.
- Bleeker, A. 2001. Ethylene. *Curr. Biol.* 11: R952.

- Bleecker, A. and H. Kende. 2000. Ethylene: A gaseous signal Molecule in plants. *Annu. Rev. Cell Biol.* 16: 1-18.
- Borsani, O., J. Zhu, P. E. Verslues, R. Sunkar and J. K. Zhu. 2005. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell* 123: 1279–129
- Brug, S. P. and E. A. Burg. 1965. Ethylene action and the ripening of fruits. *Science* 148: 1190-1196.
- Burg, S. P. 1962. The physiology of ethylene formation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 13: 265-302.
- Bufler, G. 1984. Ethylene enhanced 1-aminocyclopropane-1- carboxylic acid synthase activity in ripening apples. *Plant Physiol.* 75:192-195.
- Chen, C., D. A. Ridzon, A. J. Broomer, Z. Zhou, D. H. Lee, J. T. Nguyen, M. Barbisin, N. L. Xu, V. R. Mahuvakar, M. R. Andersen, K. Q. Lao, K. J. Livak, and K. J. Guegler. 2005. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 33: e179.
- Chuang, C. F. and E. M. Meyerowitz. 2000. Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:4985-4990.
- CSIRO. 1972. Banana ripening guide. Div. Food Res., Circular 8:1-12.
- Davis, K. M., G. E. Hobson and D. Grierson. 1988. Silver ions inhibit the ethylene-stimulated production of ripening-related mRNAs in tomato. *Plant Cell Envir.* 11:729-738.
- Dellaporta, S. L., J. Wood, and J. B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21.
- Do, Y. Y., T. S. Thay, T. W. Chang and P. L. Huang. 2005. Molecular cloning

- and characterization of a novel 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene involved in ripening of banana fruits. *J. Agri. Food Chem.* 53: 8239-8247.
- Dong, J. G., W. T. Kim, W. K. Yip, G. A. Thompson, L. Li, A. B. Bennet and S. F. Yang. 1991. Cloning of cDNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase and expression of its mRNA in ripening apple fruit. *Planta* 185: 38-45.
- Dong, J. G., D. Olson, A. Silverstone and S. F. Yang. 1992. Sequence of a cDNA coding for a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog from apple fruit. *Plant Physiol.* 98: 1530-1531.
- Duxbury, M. S., and E. E. Wang. 2004. RNA interference: A practical approach. *J. Surgical Res.* 117: 339-344.
- Dunoyer, P., C. H. Lecellier, E. A. Parizotto, C. Himber and O. Voinnet. 2004. Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *Plant Cell* 16: 235–250.
- Dunoyer, P., C. Himber and O. Voinnet. 2005. DICER-LIKE 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal. *Nat. Genet.* 37:1356–1360.
- Duxbury, M. S., M. S. MRCS, and E. E. Wang, M. D. FACS. 2004. RNA interference : A practical approach. *J. Surgical Res.* 117:339-344.
- Egley, G. H. and J. E. Dale. 1970. Ethylene, 2-chloroethylphosphonic acid and witchweed germination. *Weed Sci.* 18: 586-589.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, and C. C. Mello. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in

- Caenorhabditis elegans. Nature 391: 806-811.
- Fire, A. 1999. RNA-triggered gene silencing. Trends. Genet. 15:358-363.
- Gepstein S. and K. V. Thimann. 1981. The role of ethylene in the senescence of oat leaves. Plant Physiol. 68:349-340.
- Geraats, B. P. J., P. A. H. M. Bakker and L. C. van Loon. 2002. Ethylene insensitivity impairs resistance to soilborne pathogens in tobacco and *Arabidopsis thaliana*. Mol. Plant-Microbe Interact. 15:1078-1085.
- Geraats, B. P. J., P. A. H. M. Bakker, C. B. Lawrence, E. A. Achuo, M. Hofte and L. C. van Loon. 2003. Ethylene-insensitive tobacco shows differentially altered susceptibility to different pathogens. Am. Phytopathol. Sci. 93:813-821.
- Grierson, D., A. Slater, J. Speirs and G. A. Tucker. 1985. The appearance of polygalacturonase messenger-RNA in tomatoes - one of a series of changes in gene-expression during development and ripening. Planta 163: 263-271.
- Hamilton, A. J., M. Bouzayen and D. Grierson. 1991. Identification of a tomato gene for the ethylene-forming enzyme by expression in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7434-7437.
- Hamilton, A. J., and D. C. Baulcombe. 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. Science. 286:950-952.
- Hamilton, A., O. Voinnet, L. Chappell, and D. Baulcombe. 2002. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. EMBO J. 21 (17): 4671-4679.
- Hobson, G. E., R. Nichols, J. Davies and P. T. Atkey. 1984. The inhibition of tomato fruit ripening by silver. J. Plant Physiol. 116:21-29.
- Hoffman, N. E., S. F. Yang, A. Ichiara, and S. Sakamura. 1982. Stereospecific conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene by plant

- tissues. Conversion of stereoisomers of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to 1-butent. *Plant Physiol.* 70:195-199.
- Huang, P. L., Y. Y. Do, F. C. Huang, T. S. Thay and T. W. Chang. 1997. Characterization and expression analysis of a banana gene encoding 1-aminocyclo-propane-1-carboxylate oxidase. *Biochem. Mol. Biol. Inter.* 41: 941-950.
- Huang, F. C., Y. Y. Do and P. L. Huang. 2006. Genomic organization of a diverse ACC synthase gene family in banana and expression characteristics of the gene member involved in ripening of banana fruits. *J. Agri. Food Chem.* 54: 3859-3868.
- Hudgins, J. W., S. G. Ralph, V. R. Franceschi and J. Bohlmann. 2006. Ethylene in induced conifer defense: cDNA cloning, protein expression, and cellular and subcellular localization of 1-aminocyclopropane-1- carboxylate oxidase in resin duct and phenolic parenchyma cells. *Planta* 224: 865-877.
- Hoekema, A., P. R. Hirsch, P. J. J. Hooykaas and R. A. Schilperoort. 1983. A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *Nature* 303:179-180.
- Imaseki, H., and A. Watanabe. 1978. Inhibition of ethylene production by osmotic shock. Further evidence for membrane control of ethylene production. *Plant Cell Physiol.* 19:345-348.
- Inaba, A. X. Liu, N. Yokotani, M. Yamane, W. J. Lu, R. Nakano and Y. Kubo. 2007. Different feedback regulation of ethylene biosynthesis in pulp and peel tissues of banana fruit. *J. Exp. Bot.* 58:1047-1057.
- Jacobsen, S. E., Running M. P. and Meyerowitz E. M. 1999. Disruption of an RNA helicase/RNase III gene in *Arabidopsis* causes unregulated cell division

- in floral meristems. *Development* 126:5231-5243.
- Jefferson, R. A., T. A. Kavanagh, and M. W. Bevan. 1987. GUS fusion: -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 13: 3901-3907.
- Johnson, P. R. and J. R. Ecker. 1998. The ethylene gas signal transduction pathway: a molecular perspective. *Annu. Rev. Genet.* 32: 227-254.
- Kao, C. H. and S. F. Yang. 1982. Light inhibition of the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in leaves is mediated through carbon-dioxide. *Planta* 155: 261-266.
- Katz E. J. Riov, W. David and E. E. Goldschmidt. 2005. The climacteric-like behavior of young, mature and wounded citrus leaves. *J. Exp. Bot.* 56:1359-1367.
- Kende, H. 1993. Ethylene biosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Bio.* 44:283-307.
- Kidd, F., and C. West. 1930. Physiology of fruit. I. Changes in the respiratory activity in apples during their senescence at different temperatures. *Proc. Roy. Soc. London. Ser. B* 106:93-109.
- Klee, H. J., M. B. Hayford, K. A. Kretzmer, G. F. Barry and G. M. Kishore. 1991. Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. *Plant Cell* 3:1187-1193.
- Knoester, M., L. C. Van Loon, J. Van Den Heuvel, J. Hennig, and J. F. Bol. 1998. Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:1933-1937.
- Kobayashi K. and P. Zambryski. 2007. RNA silencing and cell-to-cell spread during *Arabidopsis* embryogenesis. *Plant J.* 50:597-604.

- Kumagai, M. H., J. Donson, G. Della-Cioppa, D. Harvey, K., Hanley, and L. K. Grill. 1995. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:1679–1683.
- Lieberman, M. 1979. Biosynthesis and action of ethylene. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 30: 533-591.
- Lincoln, J. E., S. Cordes, E. Read and R. L. Fischer. 1987. Regulation of gene expression by ethylene during *Lycopersicon esculentum* (tomato) fruit development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:2793-2797.
- Lindbo, J. A., L. Silva-Rosales, W. M. Proebsting and W. G. Dougherty. 1993. Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: Implications for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell* 5:1749–1759.
- Liu, X. S. Shiomi, A. Nakatsuka, Y. Kubo, R. Nakamura and A. Inaba. 1999. Characterization of ethylene biosynthesis associated with ripening in banana fruit. *Plant Physiol.* 121:1257-1265.
- Lopez-Gomez, R. A. Campbell, Dong, J. G., Yang, S. F. and M. A. Gomez-Lim. 1997. Ethylene biosynthesis in banana fruit: isolation of a genomic clone to ACC oxidase and expression studies. *Plant Sci.* 123: 123-131.
- Matzke M., A. J. Matzke and J. M. Kooter. 2001 RNA: guiding gene silencing. *Science* 293: 1080-1083.
- McMurchie, E. J., W. B. McGlasson and I. L. Eaks. 1972. Treatment of fruit with propylene gives information about the biogenesis of ethylene. *Nature* 237:235-236.
- Meins, Jr. J. Si-Ammour, A. and T. Blevins. 2005. RNA silencing systems and their relevance to plant development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21:297-318.

- Morgan P. W., J. C. He and M. AC. Drew. 1992. Intact leaves exhibit a climacteric-like rise in ethylene production before abscission. *Plant Physiol.* 100:1587-1590.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15(3): 473-497.A
- Neljubov, J. A., X. S. Zhang, H. Nair and S. D. O'Neill. 1993. Temporal and spatial regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase in the pollination-induced senescence of orchid flowers. *Plant Physiol.* 103:31-39.
- Nishikura, K. 2001. A short primer on RNAi: RNA-directed RNA polymerase acts as a key catalyst. *Cell.* 107:415-418.
- Nakajima, N., H. Mori, K. Yamazaki, H. Imaseki. 1990. Molecular cloning and sequence of a complementary DNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase induced by tissue wounding. *Plant Cell Physiol.* 31: 1021-1029.
- Oeller, P. W., M. W. Lu, L. P. Taylor, D. A. Pike, and A. Theologis. 1991. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science* 254: 437-439.
- O'Neill, S. D., J. A. Nadeua, X. S. Zhang, A. Q. Bui and A. H. Halevy. 1993. Interorgan regulation of ethylene biosynthetic genes by pollination. *Plant Cell* 5: 419-432.
- Park, w., J. Li, R. Song, J. messing, and X. Chen. 2002. Carpel factory, a dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Biol.* 12: 1484-1495.
- Riov J. and S. F. Yang. 1982. Effects of exogenous ethylene on ethylene production in citrus leaf tissue. *Plant Physiol.* 70:136-141.

- Rudich, J., A. H. Halevy and N. Hedar. 1972. Ethylene evolution from cucurbit plants as related to sex expression. *Plant Physiol.*49: 998-999.
- Saltveit, M. E., K. J. Bradford and D. R. Dilley. 1978. Selver ion inhibits ethylene synthesis and action in ripening fruits. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 103:472-475.
- Schenk, R. U. and A. C. Hildebrandt. 1971. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50:199-204.
- Sitrit, Y., J. Riov and A. Blumenfeld. 1986. Regulation of ethylene biosynthesis in avocado fruit during ripening. *Plant Physiol.* 81:130-135.
- Slater, A., M. J. Theologis, K. Edwards, W. Schuch and D. Grierson. 1985. Isolation and characterization of cDNA clones for tomato polygalacturonase and other ripening-related proteins. *Plant Mol. Biol.* 5: 137-147.
- Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Spanu, P., D. Reinhardt and T. Boller. 1991. Analysis and cloning of the ethylene-forming enzyme from tomato by functional expression of Its messenger-RNA in *Xenopus laevis* oocytes. *EMBO J.* 10: 2007-2013.
- Van der Straeten, D., L. Van Wiemeersch, H. M. Goodman and M. Van Montagu. 1990. Cloning and sequence of two different cDNAs encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4859-4863.
- Van Loon, L. C., B. P. J. Geraats, and H. J. M. Linthorst. 2006. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.* 11: 184-191.
- Vance, V., and H. Vaucheret. 2001. RNA silencing in plants-defense and

- counter defense. *Science* 292:2277-2280.
- Ververidis, P. and P. John. 1991. Complete recovery in vitro of ethylene-forming enzyme activity. *Phytochem.* 30: 725-727.
- Wang, K. L., H. Li and J. R. Ecker. 2002. Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell* 14: 131-151.
- Waterhouse, P. M., M. W. Graham, and M. B. Wang. 1998. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:13959-13964.
- Waterhouse P. M., M. B. Wang, E. J. Finnegan. 2001. Role of short RNAs in gene silencing. *Trends. Plant Sci.* 6:297-301.
- Wesley, S. V., C. A. Helliwell, N. A. Smith, M. B. Wang, D. T. Rouse, Q. Lin, P. S. Gooding, S. P. Singh, D. Abbott, P. A. Stoutjesdijk, S. P. Robinson, A. P. Gleave, A. G. Green, and P. M. Waterhouse. 2001. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plant. *Plant J.* 27: 581-590.
- Woodson, W. R., K. Y. Park, A. Drory, P. B. Larsen and H. Wang. 1992. Expression of ethylene biosynthetic pathway transcripts in senescing carnation flowers. *Plant Physiol.* 99:526-532.
- Wu, D. L. and S. W. Hou. 2006. Advances on mechanism and application of RNAi function in plant cell engineering. *China Biotechnol.* 26:84-90.
- Yang, S. F. and N. E. Hoffman. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher-plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35: 155-189.
- Yu, Y. B., D. O. Adams and S. F. Yang. 1979. 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, a key enzyme in ethylene biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 198:280-286.

Xiong, A. S., Q. H. Yao, R. H. Peng, X. Li, P. L. Han and H. Q. Fan. 2005. Different effects on ACC oxidase gene silencing triggered by RNA interference in transgenic tomato. *Plant Cell Rep.* 23:639-646.

Zhang, Z., J. N. Barlow, J. E. Baldwin, and C. J. Schofield. 1997. Metal-catalyzed oxidation and mutagenesis studies on the iron(II) binding site of 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate oxidase. *Biochemistry* 36:15999-16007.

Zimmerman, p. W. and F. Wilcoxon. 1935. Several chemical growth substances which cause initiation of roots and other responses in plants. *Contrib. Boyce Thompson Inst.* 7:209-229.

