

行政院及所屬各機關出國報告
(出國類別：研究)

赴美國研究「轉殖 4CL 基因樹苗之鑑定與分析」報告

服務機關：行政院農業委員會林業試驗所

出國人職稱：研究員兼主任

姓名：陳振榮

出國地區：美國密西根州

出國期間：90 年 7 月 5 日~90 年 10 月 4 日

報告日期：90 年 10 月 28 日

F8/
CO9004305

公務出國報告提要

頁數: 17 含附件: 否

報告名稱:

赴美國研究「轉殖4CL基因樹苗之鑑定與分析」報告

主辦機關:

行政院農業委員會林業試驗所

聯絡人/電話:

黃明仁/23039978#1215

出國人員:

陳振榮 行政院農業委員會林業試驗所 育林系 研究員兼主任

出國類別: 研究

出國地區: 美國

出國期間: 民國 90 年 07 月 05 日 -民國 90 年 10 月 04 日

報告日期: 民國 90 年 10 月 28 日

分類號/目: F8/林業 F8/林業

關鍵詞: 轉基因樹苗、森林生物技術、木質素遺傳工程

內容摘要: 本出國案於89年10月經行政院國家科學委員會核定，於90年7月5日前往美國密西根理工大學植物生物技術中心研究三個月，主要針對轉殖4CL基因之樹苗，進行鑑定及分析之研究工作，尤其著重於不同表達程度轉殖基因兩側核酸序列之選殖與定序工作。研究心得為：木質素遺傳工程之研究已有具體成果，林木之木質素含量降低及結構改變皆可利用基因工程方法達成；轉殖基因兩側銜接之核酸序列為影響轉殖基因表達程度的主要因子；促成林業試驗所與密西根理工大學簽署「學術交流及研究合作協定書」，有助於兩機構未來在林業研究領域的密切交流與合作。因此，建議：加強生物技術在林業應用之研究；積極蒐集及保存森林植物基因資源，備以開發森林特殊產物；以及加強與密西根理工大學進行學術交流。

本文電子檔已上傳至出國報告資訊網

目 次

一、目的	-----	1
二、過程及主要研究內容	-----	1
三、心得及返國後從事之工作	-----	14
四、建議事項	-----	17

一、目的

本出國案係經服務機關-農業委員會林業試驗所推薦，參加行政院國家科學委員會第三十九屆補助科學與技術人員國外短期研究之遴選，並經審定，前往美國密西根理工大學(Michigan Technological University)，從事「轉殖 4CL 基因樹苗之鑑定與分析」研究三個月，其主要之目的，除了實際參與鑑定重組 4CL 基因嵌入轉基因樹苗之染色體基因組，以及探討造成苗木性狀改變之機制等實驗室技術之研習外，尚有攜回研究所需之關鍵性材料及技術引進等任務之完成。

二、過程及主要研究內容

(一)過程

依照行政院國家科學委員會函送「第三十九屆補助科學與技術人員國外短期研究須知」之國外研究有關規定，取得美國密西根理工大學植物生物技術研究中心同意前往研究之邀請函、與推薦機構簽訂合約並送國科會備查，以及完成其他出國前應辦手續後，於九十年七月五日搭機離台前往美國，翌日(七月六日，星期五)前往植物生物技術研究中心報到，隨即開始為期三個月的研究，期間因為研究中心主任 Dr. Vincent L. Chiang 極力邀請，於七月二十一日隨同他前往華盛頓州的 Stevenson，參加世界林業研究聯盟(UFRO)舉辦有關林木分子生物學及生物技術(Tree Molecular Biology and Biotechnology)之研討會，至七月二十七日返回密西根理工大學。該項參加研究計畫有關之學術性會議，已依照國科會第三十九屆補助科學與技術人員國外短期研究須知之國外研究有

關規定，向我國駐美代表處華盛頓科學組提送，參加學術性會議之相關資料及報告，並獲准核定。除此之外，研究期間完全專注於既定之研究計畫工作，平均每天工作十二小時以上，且包含週末及假日亦然，直到三個月期滿，於九十年十月四日返抵台灣，十月五日回到林業試驗所正常上班。

(二)主要研究內容

吾人皆知，木材的三大組成分為：纖維素、半纖維素及木質素，分別約佔木材之 45%、20%及 30%。一般化學製漿的過程，簡言之，即為利用能源與化學藥劑，將木質素降解移除後，收集纖維素，用以造紙。因此，如何將林木木質部之木質素含量減少，或者改變木質素單體組成比率，促其易於降解移除，以期大量降低製漿能源與化學藥劑的使用量，而達成降低生產成本、增加纖維收率及減少污染之目標，一直是近十餘年來，從事森林生物技術與林木遺傳工程研究的一項重要挑戰。

美國密西根理工大學植物生物技術研究中心的研究人員，經過十餘年的堅持與努力，終於從顫楊(*Populus tremuloides*; quaking aspen)選殖到 4-coumarate: coenzyme A ligase (4CL) 之木質素合成專一性基因，並將其改造重組後，利用基因轉殖之技術送回顫楊，而培育出大量降低木質素含量之樹苗。此一成果已發表於 *Nature Biotechnology* (1999) 17: 808-812 (Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees)，該研究報告計檢測 9 株轉殖反轉式(antisense) 4CL 基因之轉基因樹苗，木質素含量之降低從 5%至 45%不盡一

致。此外，轉殖之重組性(recombinant) 4CL 基因，係銜接在花椰菜鑲嵌病毒啟動子(cauliflower mosaic virus 35S promoter)之後，而導致樹苗葉部形態改變等相當複雜的後遺效應。因此，在從事類似並附加改良木質素單體組成比率之試驗時，他們已經將重組性基因，改以加裝木質部專一性之啟動子(xylem-specific promoter)，企圖使轉殖的重組性基因僅於轉基因樹苗之木質部表達。

雖然使用了木質部專一性之啟動子，已經克服了重組性 4CL 基因在轉基因樹苗任何組織或器官隨意表達之困擾，但是仍然發現，轉殖重組性 4CL 基因的樹苗，其木質素含量的降低程度尚存有非常大的差異。為了探討造成此一不尋常現象之原因，在密西根理工大學植物生物技術研究中心教授兼主任 Dr. Vincent L. Chiang 及助教授 Dr. Laigeng Li 的協助下，篩選出擬轉殖重組性 4CL 基因的樹苗，4 株分屬不同轉殖系(transgenic line)，編號為 21、23、31 及 33，先利用 Klason 方法，測定其木質部之木質素含量，分別為 16.01、14.39、23.51 及 22.00%。因為非轉殖顫楊樹苗之平均木質素含量為 22%，依此 21 與 23 號樹苗之木質素含量已降低約 27 及 34%，而 31 與 33 號樹苗之木質素含量則未見降低。

接著，開始利用修正過的 Doly 方法，從前述 4 株轉基因樹苗的葉部萃取總量基因組核酸(total genomic DNA)，再利用合成酶連鎖反應(polymerase chain reaction)及南方雜交(Southern hybridization)方法，進行轉殖重組性基因之鑑定。確認 4 株苗木皆帶有重組性之轉殖基因，而且穩定的嵌入顫楊染色體基因組(圖

1)。

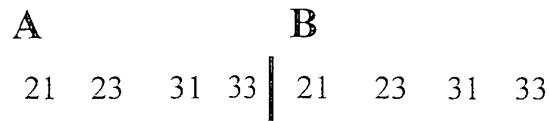


圖 1:利用南方雜交方法，確認反轉式 4CL 基因已經嵌入測試的 4 株轉基因苗木。A)染色體核酸經過一個酶切，顯示 4 株苗木各有一個轉殖基因嵌入位置，而且形成 2 種嵌入點；B)染色體核酸經過雙重酶切，確認 4 株苗木皆有轉殖基因嵌入。

經確認為轉基因樹苗後，依照 Universal GenomeWalker Kit (Clontech)的操作步驟，先檢驗總量基因組核酸之品質，再將 4 株轉基因樹苗之總量基因組核酸，分別以 4 種核酸酶截切後純化，並加裝 adaptors，而建立不同類型之基因庫。

另外，自行設計訂製 4 個不同的核酸引子，分別為: RBCW1 (5'-CCAAACGTAAAACGGCTTGTCCCGCG-3')、RBCW2 (5'-GGGG TCATAACGTGACTCCCTTAATT-3')、LBCW1 (5'-ATTTTCGCCTGC TGGGGCAAACCAGC-3')及 LBCW2 (5'-CGCTTGCTGCAACTCTCT CAGGGCCA-3')。隨後，以各個基因庫之核酸做為模板，加上自行設計及 adaptor 之引子，進行合

成酶連鎖反應，複製出不同核酸片段。再將不同核酸片段，分別從 agarose 膠上，提出純化，然後選殖到質體核酸，再轉移到 competent cell 的大腸桿菌。隨之，依循養菌、萃取質體核酸及自動定序儀之備料與操作過程，而進行核酸定序。

總計選殖了 31 個核酸片段，其中經成功定序且具有參考價值之核酸序列，分別有選殖自 21 號樹苗之 Chen-21-2BL-1、Chen-21-2BL-3 及 Chen-21-3BL-3，選殖自 23 號樹苗之 Chen-23-2BL-2 full length (含 Chen-23-2BL-2、Chen-23-2BL-2SF、Chen-23-2BL-2SR、Chen-23-2BL-2+2R 及 Chen-23-2BL-2vector+2SF)、Chen-23-2BL-3、Chen-23-2BR-2、Chen-23-3BR-1F、Chen-23-3BR-1R 及 Chen-31-1BL-1R，以及選殖自 31 號樹苗之 Chen-31-1BL-1R。這些核酸之序列詳列如下：

Chen-21-2BL-1

```
TAAGTGTCTAAGCGTCCAATTTGTTTACACCACAATATTCCCGGC
CACCAGCCTAGCCTGCAAGCTCTCCTGACCGGCAGCTCGGGCC
CAAATCACCCTCGATACAGGCAGCCATCAGTCCGGGACGG
CGTCAGCGGGAGATCCGTTGTAAGGCGGCAGACTTTGCTCATG
TTACCGATGCTATTCGGAAGAACGGCAACTAAGCTGCCGGGTTT
GAAACACGGATGATCTCGCGGGGGTAGCATGTTGATTGTAAC
GATGACAGAGCGTTGCTGCCTGTGATCAAATATCATCTCCCTCG
CAGAGATCCGAATTATCAGCCTTCTTATTCAATTTCTCGCTTAACC
GTGACAGGCTGTCGATCTTGAGAACTATGCCGACATAATAGGAA
ATCGCTGGATAAAGCCGCTGAGGAAGCTGAGTGGCGCTATTTCT
TTAGAAGTGAACGTTGACGATACCAGCCCGGGCCGTCGACCAC
```


GCGTGCCCTATAGT

Chen-21-2BL-3

TTACACCNCCAATATATCCTGCCACCAGCCAGCCAACAAGCTCT
CCGACCGGCAGCTCGGCTCAAATCTCCACTCGATACAGGCAG
CCCATCAGTCCNGGACGGCGTCAGCGGGAGAGCCGTTGTAAGG
CGCAGACTTTGCTCATGTTACCGATGCTATTCGGAAGAACGGCA
ACTAAGCTGCCGGGTTTGAAACACGGATGATCTCGCGGGGGGT
AGCATGTTGATTGTAACGATGACAGAGCGTTGCTGCCTGTGATC
AAATATCATCTCCCTCGCAGAGATCCGAATTATCAGCCTTCTTAT
TCATTTCTCGCTTAACCGTGACAGGCTGTCGATCTTGAGAACTA
TGCCGACATAATAGGAAATCGCTGGATAAAGCCGCTGAGGAAG
CTGAGTGGCGCTATTTCTTTAAAAGTGAACGTTGACGATACCAG
CCCGGGCCGTCGACCACGCGTGCCCTATAGT

Chen-21-3BL-3

CCGACCGGCAGCTCGGCACAAAATCACC ACTCGATACAGGCAG
CCCATCAGTCCGGGACGGCGTCAGCGGGAGAGCCGCTGTAAGG
CGGCAGACTTTGCTCATGTTACCGATGCTATTCGGAAGAACGGC
AACTAAGCTGCCGGGTTTGAAACACGGATGATCTCGCGGGGGG
TAGCATGTTGATTGTAACGATGACAGAGCGTTGCTGCCTGTGAT
CAAATATCATCTCCCTCGCAGAGATCCGAATTATCAGCCTTCTTA
TTCATTTCTCGCTTAACCGTGACAGGCTGTCGATCTTGAGAACT
ATGCCGACATAATAGGAAATCGCTGGATAAAGCCGCTGAGGAA
GCTGAGTGGCGCTATTTCTTTAAAAGTGAACGTTGACGATACCA
GCCCCGGGCCGTCGACCACGCGTGCCCTATAGT

Chen-23-2BL-2

AATTTTAAAAGCCTTCCAAAATTTTCGCAATCCGTCGGTGATTC

CGTCGGGAATCTGACAAGTCAAGAGGCACATTAACCAACGCAC
TTGGAAAACGGCGCGGTCCGTCCGTAATATATGTAACCGACAAA
TTACCCGACGGACCTACGCCGTCCGTAATCCCGTCGATGGTGGT
GTTATGTTTTTCGAGCTTATTGTGAGATGCCGGCGGAGTTTATTCC
GTCGGTATGGCCGTCCGGTGATTGTGGCATTGTTGTTGTAATATTT
TCGAACTCTCTGCGATATAACCGCGGGTGGTTATCCGTCCGGTAT
GGCCGTTGGCGATTGTGGCATTATGCAGGAAAGGTTGTCTTTGT
ATTGCAGGTTTACCTTCCTGCAATAACTTAACTGATAAACTGTCT
ATCACATAAAACAATAACCACATTGCTTAAACAATAAATATTTTG
TTTTACAAAATACATCATCAATAATTAAATTACATGAGACAAAT
GTTTTTACATAGGGCTTCTTTTCATAATTAGTCGGAATTTTCTTCT
TCTTCCTCATCAATTGAATTGTATCATCTTCATCGCAATCTTCAA
TATGGATACCAGTCCGGGCCGTCCGACCACGCGTGCCCTATAGT

Chen-23-2BL-2SF

ACAACAAAAACACCAACACAACAAAAATAAAAACAACTAAA
AATAAAATAAAATAAAATAAATTAGAAAAAAAACACATACCTTT
TAATATAATGAAGATTTACAACACCAAATCATGCTAGAGATTA
GGTGAAGGTGTTTAAGGATTGATGGGGAAAAAATGAAAAATC
TAAGGTGAAAAACGGAGGAGAAGAGAAGAAGCGGCGGGGAG
AAGAAGAAAAAATGAGAAGAAGCGGCGGGGCTGGA ACTTATG
GGTCAATTTTACCGACGGCATCACCGACGGGATTACCATCCGTC
GGTAACAGGGCAAATTCGGTCCGTAACAGGTCAAATTCGGT
CGGTATTTTTCGAATTTTCGCCCCGAATTTTAAAAGCCCTCAA
AATTTTCGCAATCCGTCCGGTGATTCCGTCCGGTAATCTGACAAGT
TCAGAGGCACATTAACCAACGCACCTTTGGAAAACGCGCGGTCC
GTCGGTAATATATGTAACCGACAAATTACCGACGACCTACGCCG
TCGGTAATCCCGTCGATGGTGGTGTATGTTTTTCGAGCTTATTGT
GAGATGCCGACGGAGTTTATTCCGTCCGGTATGGCCGCGGTGATT

GTGGCATT TTTGTTGGNAAATATTTTCGAACTCTCTGCGATATAACC
GGCGGGTGGTTATCCGTCGGTATGGCCGTGGCGATTG

Chen-23-2BL-2SR

AATATACATCCTTAATAATGTGTCTGAATTCAA AACTTTATTACAT
TACAACAAAAACACCAACTCAACAAAAATAAAAACA ACTAA
AAATAAAATAAAATAAAATAAATTAGAAAAAAAACACATACCTT
TTAATATAATGAAGATTTACAACACCAAATCATGCTAGAGATTAA
AGGTGAAGGTGTTTAAGGATTGATGGGGAAAAAAATGAAAAAT
CTAAGGTGAAAAACGGAGGAGAAGAGAAGAAGCGGCGGGGA
GAAGAAGAAAAAATGAGAAGAAGCGGCGGGGCTGGA ACTTAT
GGGTCAATTTTACCGACGGCATCACCGACGGGATTACCATCCGT
CGGTAACAGGGCAA AATTCCGTCGGTAACAGGTCAA AATTCCG
TCGGTATTTTTCGAATTTCCGCCCCGAATTTT TAAAAGCCCTCCAA
AATTTTCGCAATCCGTCGGTGATTCCGTCGGTAATCTGACAAGT
TCAGAGGCACATTAACCAACGCACTTTGGAAAACGCGCGGTCC
GTCGGTAATATATGTAACCGACAAATTACCGACG

Chen-23-2BL-2+2R

AATATACATCCTTAATAATGTGTCTGAATTCAA AACTTTATTACAT
TACAACAAAAACACCAACTCAACAAAAATAAAAACA ACTAA
AAATAAAATAAAATAAAATAAATTAGAAAAAAAACACATACCTT
TTAATATAATGAAGATTTACAACACCAAATCATGCTAGAGATTAA
AGGTGAAGGTGTTTAAGGATTGATGGGGAAAAAAATGAAAAAT
CTAAGGTGAAAAACGGAGGAGAAGAGAAGAAGCGGCGGGGA
GAAGAAGAAAAAATGAGAAGAAGCGGCGGGGCTGGA ACTTAT
GGGTCAATTTTACCGACGGCATCACCGACGGGATTACCATCCGT
CGGTAACAGGGCAA AATTCCGTCGGTAACAGGTCAA AATTCCG
TCGGTATTTTTCGAATTTCCGCCCCGAATTTT TAAAAGCCCTCCAA

AATTTTCGCAATCCGTCGGTGATTCCGTCGGTAATCTGACAAGT
TCAGAGGCACATTAACCAACGCACCTTTGGAAAACGCGCGGTCC
GTCGGTAATATATGTAACCGACAAATTACCGACGACCTACGCCG
TCGGTAATCCCGTCGATGGTGGTGTATGTTTTTCGAGCTTATTGT
GAGATGCCGGCGGAGTTTATTCCGTCGGTATGGCCGTCGGTGAT
TGTGGCATTTTGTTGTAATATTTTCGAACTCTCTGCGATATAACC
GGCGGGTGGTTATCCGTCGGTATGGCCGTTGGCGATTGTGGCAT
TATGCAGGAAAGGTTGTCTTTGTATTGCAGGTTTACCTTCCTGC
AATAACTTAACTGATAAACTGTCTATCACATAAAACAATAACCA
CATTGCTTAAACAATAAATATTTGTTTTACAAAATACATCATCAA
TAATTTAAATTACATGAGACAAATGTTTTTACATAGGGCTTCTTT
TCATAATTAGTCGGAATTTTCTTCTTCTTCCTCATCAATTGAATTG
TCATCATCTTCATCGCAATCTTCAATATGGATACCAGTCCGGGCC
GTCGACCACGCGTGCCCTATAGT

Chen-23-2BL-2vector+2SF

CGCTTGCTGCAACTCTCTCAGGGCCAGGCGGTGAAGGGCAATC
AGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTGAAGAAAACCACCCAGT
ACATTAACCGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTCTAAGCGTC
AATTTGTTTACACCACAAATATTCAATAAATTCAACAATTAAATT
CAATTATTCAACAATTAAATTACCAAATATTCAACAATTCAAAA
AATTCGAAAATTCAACTTTAACTAATTCTAAGTTAAATTAATA
ATAACAATTCTAACAACACAATAAAAAATATTCAATAAATTC
AACAAATTAAATTCAATTATTCAACAATTAAATTAACAATATTCA
ACAAATTCAAAAAATTCTCAAAAAATTCAAATAAAAAAGGAAC
GAAATATACATACCTTAATAATGTGTCAAATTCAAACCTTTATTTA
CATTACAACAAAAACACCAACACAACAAAAATAAAAACAACT
AAAAATAAAATAAAATAAAATAAATTAGAAAAAAACACATACC
TTTTAATATAATGAAGATTTACAACACCAAATCATGCTAGAGATT

AAAGGTGAAGGTGTTTAAGGATTGATGGGGAAAAAAATGAAAA
ATCTAAGGTGAAAAACGGAGGAGAAGAGAAGAAGCGGCGGGG
AGAAGAAGAAAAATGAGAAGAAGCGGCGGGGCTGGAACCTA
TGGGTCAATTTTACCGACGGCATCACCGACGGGATTACCATCCG
TCGGTAACAGGGCAAATTCGTCGGTAACAGGTCAAATTC
GTCGGTATTTTTCGAATTCGCCCGAATTTTTTAAAAGCCCTCCA
AAATTTTCGCAATCCGTCGGTGATTCCGTCGGTAATCTGACAAG
TTCAGAGGCACATTAACCAACGCACCTTTGGAAAACGCGCGGTC
CGTCGGTAATATATGTAACCGACAAATTACCGACGACCTACGCC
GTCGGTAATCCCGTCGATGGTGGTGTATGTTTTTCGAGCTTATTG
TGAGATGCCGACGGAGTTTATTCCGTCGGTATGGCCGCGGTGAT
TGTGGCATTGTTGGNAAATATTTTCGAACTCTCTGCGATATAC
CGGCGGGTGGTTATCCGTCGGTATGGCCGTGGCGATTG

Chen-23-2BL-2 full length

CGCTTGCTGCAACTCTCTCAGGGCCAGGCGGTGAAGGGCAATC
AGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTGAAAAGAAAAACCACCCAGT
ACATTA AAAACGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTCTAAGCGTC
AATTTGTTTACACCACAAATATTCAATAAATTCAACAATTAAATT
CAATTATTCAACAATTAAATTACCAAATATTCAACAATTCAAAA
AATTCGAAAAATTCAACTTTAACTAATTCTAAGTTAAATTAATA
ATAACAATTCTAACAACACAATAAAAAATATTCAATAAATTC
ACAATTAAATTCAATTATTCAACAATTAAATTAACAATATTCA
ACAAATTCAAAAAATTCTCAAAAAATTCAAATAAAAAAGGAAC
GAAATATACATACCTTAATAATGTGTCAAATTCAAACCTTTATTTA
CATTACAACAAAAACACCAACACAACAAAAATAAAAAACAAC
AAAAATAAAATAAAATAAAATAAATTAGAAAAAAAACACATACC
TTTTAATATAATGAAGATTTACAACACCAAATCATGCTAGAGATT
AAAGGTGAAGGTGTTTAAGGATTGATGGGGAAAAAAATGAAAA

ATCTAAGGTGAAAAACGGAGGAGAAGAGAAGAAGCGGCGGGG
AGAAGAAGAAAAAATGAGAAGAAGCGGCGGGGCTGGAACCTTA
TGGGTCAATTTTACCGACGGCATCACCGACGGGATTACCATCCG
TCGGTAACAGGGCAAATTCGGTCGGTAACAGGTCAAATTC
GTCGGTATTTTTCGAATTCGCCCGAATTTTTAAAAGCCCTCCA
AAATTTTCGCAATCCGTCGGTGATTCCGTCGGTAATCTGACAAG
TTCAGAGGCACATTAACCAACGCACTTTGGAAAACGCGCGGTC
CGTCGGTAATATATGTAACCGACAAATTACCGACGACCTACGCC
GTCGGTAATCCCGTCGATGGTGGTGTATGTTTTTCGAGCTTATTG
TGAGATGCCGGCGGAGTTTATTCCGTCGGTATGGCCGTCGGTGA
TTGTGGCATTGTTGTAAATATTTTCGAACTCTCTGCGATATAC
CGGCGGGTGGTTATCCGTCGGTATGGCCGTTGGCGATTGTGGCA
TTATGCAGGAAAGGTTGTCTTTGTATTGCAGGTTTACCTTCCTGC
AATAACTTAACTGATAAACTGTCTATCACATAAAACAATAACCA
CATTGCTTAAACAATAAATATTTTGTGTTTACAAAATACATCATCAA
TAATTTAAATTACATGAGACAAATGTTTTTACATAGGGCTTCTTT
TCATAATTAGTCGGAATTTTCTTCTTCTCCTCATCAATTGAATTG
TCATCATCTTCATCGCAATCTTCAATATGGATACCAGTCCGGGCC
GTCG (1375)

Chen-23-2BL-3

ACTATAGGGCACGCGTGGTCGACGGCCCGGGCTGGTATCGTCA
ACGTTCACTTCTAAAGAAATAGCAGCCACTCAGCTTCCTCAGCG
GCTTTATCCAGCGATTTCCCTATTATGTCGGCATAGTTCTCAAGAT
CGACAGCCTGTCACGGTTAAGCGAGAAATGAATAAGAAGGCTG
ATAATTCGGATCTCTGCGAGGGAGATGATATTTGATCACAGGCA
GCAACGCTCTGTCATCGTTACAATCAACATGCTACCCTCCGCGA
GATCGTCCGTGTTTCAAACCCGGCAGCTTAGTTGCCGTTCTTCC
GAATAGCATCGATAGCATGAGCAAAGTCTGCCGCCTTACAACGG

CTCTCCCGCTGACGCCGTCCCGGACTGATGGGCTTGCCTGTATC
GAGTGGTGATTTTGTGCCGAGCTGCCGGTCGGGGAGCTGTTGG
CTGGCTGGTGGCAGGATATATTGTGGTGTAACAAATTGACGCTT
AGACAACCTCAATAACACATTGCGGACGTTTTTAATGTAAGTGGGG
TGGTTTTTCTTTTCACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGGATTGGC
CTTCCCGGCTGGCCCTTGAGAGAGTTGCAACAAGCCGAAGGG
CGAATTCTGGCAGAAATTCCATCACCTGGGCGGGCCGTTTCGAG
CTGCATTTAAAAGGGCCCAATTCGCCTAAAGGGGAGTCGAATTA
CAATCACTGGCCCGCGTTTA

Chen-23-2BR-2

ACTATAGGGCACGCGTGGTCGACGGCCCGGGCTGGTATCCATAT
TGAAGATTGCGATGAAGATGATGACAATTCAATTGATGAGGAAG
AAGAAGAAAATTCCGACTAATTATGAAAATGAAGCCCTATGTAA
AAACATTTGTCTCATGTAATTTAAATTATTGATGATGTATTTTGTA
AAACAAAATATTTATTGTTTAAGCAATGTGGTTATTGTTTTATGT
GATAGACAGTTTATCAGTTAAGTTATTGCAGGAAGGTAAACCTG
CAATACAAAGACAACCTTTCCTGCATAATGCCACAATCGCCAAC
GGCCATACCGACGGATAACCATCCGTCGGTATGTCACAGAGAGT
TCGAAAATATTTACAACAAAATGCCACAATCACCGACGGCCATA
CCGACGGAATAAACTCCATCGGCATCTCACAATAAGCTCGAAA
ACATAACACCACCATCGACGGGATTACCGACGGCGTAGGTCGTC
GGTAATTTGTCGGTTACATAATATTACCGACGGACCGCGCGTTTTT
CAAAGTGCGTTGATTAATGTGCCTCTGAACTTGTCAGATTACCC
GACGGAATCCCCGACGGATTGGCGAAAATTTTGGANGGCTTTT
AAAAATTC

Chen-23-3BR-1F

ACTATAGGGCACGCGTGGTCGACGGCCCGGGCTGGTCTGCGCA

AGGAACGCCCGTCGTGGCCAGCCACGATAGCCGCGCTGCCTCG
TCCTGCAGTTCATTCAGGGCACCGGACAGGTTCGGTCTTGACAA
AAAGAACCGGGCGCCCCTGCGCTGACAGCCGGAACACGGCGG
CATCAGAGCAGCCGATTGTCTGTTGTGCCAGTCATAGCCGAAT
AGCCTCTCCACCCAAGCGCCCGGAGAACCTGCGTGCAATCCAT
CTTGTTCAATCATGCGAAACGATCCAGATCCGGTGCAGACTATT
TGGATTGAGAGTGAATATGAGACTCTAATTGGATACCGAGGGGA
ATTTATGGAACGTCAGTGGAGCATTTTTGACAAGAAATATTTGCT
AGCTGATAGTGACCTTAGGCGACTTTTGAACGCGCAATAACGGT
TTCTGACGTATGTGCTTAAGCTCATTAAACTCCAGAAACCCGCG
GCTGAGTGGCTCCTTCAACGTTGCGGTCTGTCAGTTCCAAACGT
AAAACACTGATAGGTTAAACTGAAGGCGGGAAACGACAATCTG
ATCATGAGCCGGAGAATTAAGGGAAGTACGGTATTGACC

Chen-23-3BR-1R

CCGGAGAACCTGCGTGCAATCCATCTTGTTCAATCATGCGAAAC
GATCCAGATCCGGTGCAGACTATTTGGATTGAGAGTGAATATGA
GACTCTAATTGGATACCGAGGGGAATTTATGGAACGTCAGTGGGA
GCATTTTGAACAAGAAATATTTGCTAGCTGATAGTGACCTTAGG
CGACTTTTGAACGCGCAATAACGGTTTCTGACGTATGTGCTTAG
CTCATTAAACTCCAGAAACCCGCGGCTGAGTGGCTCCTTCAAC
GTTGCGGTTCTGTCAGTTCCAAACGTAAAACACTGATAGTTTAA
ACTGAAGGCGGGAAACGACAATCTGATCATGAGCGGAGAATTA
AGGGAGTCACGTTATGACC

Chen-31-1BL-1R

CGCTTGCTGCAACTCTCTCAGGGCCAGGCGGTGAAGGGCAATC
AGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTGAAAAGAAAAACCACCCAGT
ACATTAAAAACGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTCTAAGCGTC

AATTTGTTTACACCACAATATATCCTGCCACCAGCCAGCCAACA
GCTCCCCGACCGGCAGCTCGGCACAAAATCACCCTCGATAACA
GGCAGCCCATCAGTCCGGGACGGCGTCAGCGGGAGAGCCGTT
GTAAGGCGGCAGACTTTGCTCATGTTACCGATGCTATTTCG

三、研究心得及返國後從事之工作

(一)研究心得

森林生物技術應用在林業之研究，大致包含：抗殺草劑、抗病蟲害、雄(雌)性不稔(孕)、抗環境逆壓，以及改變林木形態及木材組成份等主要領域，其中要數利用遺傳工程方法改變木材組成份之研究進展最為快速且成效顯著。林木基因選殖與轉殖之研究雖然行之有年，但是直到 1999 年，密西根理工大學成功培育出轉殖反轉式 4CL 之顛楊苗木，並証實木材的木質素含量下降，纖維素含量提高，而且還有加速生長之現象。至此，生物技術應用在木材組成份改變之研究成果，已經非常具體。經由此次的出國研究，將主要的三點心得，列之如下：

- 1.木質素遺傳工程之研究成果雖然已經獲得具體的成果，也促使密西根理工大學植物生物技術中心的研究群在森林生物技術研究領域，走出一條創新之途徑，且居於世界領先之地位，但是該研究群之研究人員並不以此為自滿，仍然日以繼夜不辭辛勞的繼續從事研究工作，更進一步的將研究成果往前推進到整個木質素生成路徑的釐清(The Plant Cell (2001)13:1567-1585)，因而發展出多重基因之林木基因轉殖體系，將反轉式之 4CL 基因與正轉式 coniferaldehyde 5-hydroxylase (Cald5H)基因同時轉殖，並生產出

低木質素含量，高 guaiacyl/syringyl (G/S)比率之轉基因樹苗(未發表，申請專利中)。這些新近的研究成果的確令人嘆為觀止，感謝服務機關的推薦及國科會的補助，得以前往密西根理工大學從事此次三個月的研究，並獲得最新的研究成果資料，也因此有機會讓國內在從事自行選拔樹種的相關研究加緊腳步、急起直追，希望能夠在最短的未來獲得相同的研究成果。

2.相同架構之重組性轉殖基因(transgene)在轉基因動植物體內之表達程度不同，進而導致不同的影響結果。這是在從事轉基因生物過程常見的一種現象，過去的研究都將其歸咎於轉殖基因嵌入受體染色體基因組的隨機性，而產生轉殖基因嵌入數量與位置的不同，致有 copy number 與 position effect 之說。但是新近的研究則逐漸證實，受體生物之染色體基因組在接受轉殖基因嵌入時，經常會有一段核酸參與轉殖機制，而且在轉殖完成後，會以重複雷同序列的型態，銜接在轉殖基因的兩側。此核酸片段謂之基座連接區域(scaffold or matrix attachment region)，簡稱為 SAR 序列。雖然 SAR 序列在生物體內的真正功能尚未全然清楚，但是一些研究的佐證，已經認為其為基因複製的起源，而且參與染色體的緊縮作用。此外，尚具有富含 A 與 T 核苷酸及 Topoisomerase II (Topo II)酶切之位置，因而會引導雙股核酸之解鏈等生物性特徵。最近證實的一項重要功能是，SAR 序列的參與轉基因機制，會使轉殖效率提高，轉殖基因嵌入染色體基因組的數量減少，以及轉殖基因之表達大量提昇。因此，密西根理工大學的研究群雖然已經證實，轉殖反轉式 4CL 基因，會造成轉基因樹苗之木質素含量降

低，但是木質素含量降低的變幅則因不同轉殖系之苗木而不同，究其原因，可能與 SAR 序列參與轉殖基因機制具有密切關聯，所以轉殖基因嵌入位置兩側應該銜接有 SAR 序列，則為合乎邏輯的推測。因此，本次出國研究在鑑定轉殖 4CL 基因樹苗之工作，大部分集中精力於轉殖基因兩側核酸序列的選殖，歷經三個月的努力，完成前述選殖與定序之核酸片段，其中也在例如 Chen-23-2BL-2 之核酸片段，查出 SAR 序列之蹤跡，可供進一步確認及改造利用。雖然核定的三個月研究期間，似乎嫌短了些，可是相信已經為轉基因樹苗之 SAR 序列建立了良好的研究開端。

3. 三個月的研究期間，除了親身從事前述的研究工作之外，也蒐集了相當多的研究成果資料與發表之報告，同時也促成密西根理工大學校長與本所(台灣林業試驗所)所長，在兩地完成簽署機構間之「學術交流及研究合作協定書」，該協定書草案並先報經行政院農業委員會核定後簽署。因為此一協定書的簽署，得以順利推展雙方的實質交流，我方並已獲得部分智產權與基因的授予及使用，可謂計畫研究工作之外的收穫。

(二)返國後從事之工作

自從九十年十月五日返國續職後，除了處理兼辦育林系主任之行政職務外，最主要主持的科技研究計畫為：農委會林業試驗所之公務預算計畫「桉樹類基因轉殖技術之開發及應用」與國科會補助計畫「轉殖外源 4CL 基因至優良赤桉品系之研究」。此外，仍然抽空持續進行在密西根理工大學未完成之研究工作，希冀將轉基因兩側銜接之 SAR 序列完整選殖後，加以鑑定、改造以及利

用，並真正與執行的科技計畫融為一體，使其功能發揮至最大。

四、建議事項

- (一)加強生物技術在林業應用之研究：生物技術之開發除了對於學術研究之顯著貢獻外，近年來已為多種產業應用，更發展成為生物技術產業。雖然其於林業上之技術開發與應用較之其他產業明顯慢速，但是這並不意味不具潛力，例如：密西根理工大學研究群對於木質素含量降低及結構改變之研究，已經建立非常完整的技術體系、生產出轉基因樹苗及申請得多項專利，同時與數家歐美大型林業或製漿造紙公司合作，積極推展企業化之經營模式。
- (二)積極蒐集及保存森林植物基因資源，備以開發森林特殊產物：森林孕育多樣性之植物及基因資源，在加強保護森林自然資源之前提下，對於含有特殊成分、風味或療效之植物，也應該積極蒐集保存，除可供作基因資源開發之研究外，更可另闢森林特殊產物之實質應用。
- (三)加強與密西根理工大學進行學術交流：林業試驗所報經農業委員會核備，已經正式與美國密西根理工大學簽訂林業領域之「學術交流及研究合作協定書」，值得考量利用該大學已有傑出研究之技術、人才及軟硬體設備，尤其在森林生物技術及野生動物之研究，加強學術之交流，藉以加速提昇國內林業相關研究之水準。