

# 基因轉殖 PFLP 香蕉於促進抗香蕉黃葉病之研究

關政平<sup>1</sup> 陳柏亨<sup>2</sup> 陳涵葳<sup>1,\*</sup> 馮騰永<sup>3</sup> 楊佐琦<sup>4</sup>

## 摘要

關政平、陳柏亨、陳涵葳、馮騰永、楊佐琦。2018。基因轉殖 PFLP 香蕉於促進抗香蕉黃葉病之研究。台灣農業研究 67(2):209–217。

由 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) 引起之香蕉黃葉病已被認定為世界性的香蕉病害，目前仍無化學或殺菌劑可以有效防治。為減少黃葉病所造成香蕉產業損失，利用育種方式找出抗病品種或是藉發展抗病之基因轉殖香蕉為有效的防治手段之一。本研究旨在探討轉殖基因香蕉之抗病力，以及發展一種葉片分級評估系統來分析 Foc 對香蕉造成的危害，作為香蕉抗黃葉病之效果評估，試驗對象包括各個具有表現 plant ferredoxin-like protein (PFLP) 基因之各香蕉轉植株。並利用 PFLP 基因之轉殖系與非 PFLP 基因轉殖之香蕉作為判斷是否具有抗香蕉黃葉病之效果。試驗過程同時加入等量之 Foc 孢子懸浮液與相同試驗條件感染香蕉，以評估各處理香蕉罹病情形，並藉由 polymerase chain reaction (PCR) 技術檢測外源基因之存在與否。轉殖系種植病土後經過不同時期至約 8 wk 左右，利用葉部黃葉率試驗評估法進行香蕉苗之抗黃葉病效果評估，並挑選出具抗病之香蕉植株。結果顯示，MCPER-3-4 轉植株為 7 種供試轉植株中相對最抗黃葉病的植株。由本研究結果顯示，PFLP 基因的存在似能提高香蕉抗黃葉病罹病率，未來將進行田間抗病的長期觀察做進一步驗證。

**關鍵詞：**香蕉、香蕉黃葉病、巴拿馬病、耐病性。

## 前言

香蕉 (*Musa* spp.) 為芭蕉科 (Musaceae) 芭蕉屬草本植物，原產於東南亞、馬來群島及澳洲北部，主要分布在熱帶及亞熱帶。根據農糧署統計資料顯示，2016 年台灣香蕉產量為 25 萬噸，年產值達 75 億元，是台灣重要的經濟果樹之一。但台灣地處熱帶及亞熱帶交界處，海島型氣候導致夏季高溫多雨，容易滋生各種病害且不易防治。出現在台灣的香蕉病害為真菌性的黃葉病 (*Fusarium wilt*)、黑星病 (banana freckle)，以及病毒性的嵌紋病 (banana mosaic disease) 和萎縮病 (banana bunchy top virus) 等 (Daniells 2009)。其中，香蕉黃葉病又稱巴拿

馬病 (Panama disease)，其病原為尖鏽孢菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*; Foc)，為土傳性病害 (soil-borne disease)，生長型態包含了小孢子體 (microconidia)、大孢子體 (macroconidia)、厚膜孢子體 (chlamydo spores) 以及菌絲體 (mycelia) (Smith 2007)。1968 年時在屏東縣佳冬鄉首次發現黃葉病例，香蕉黃葉病目前共發現有 4 個生理小種 (races)，各生理小種的宿主香蕉品種亦不盡相同。第一生理小種主要感染「大米七」(‘Gros Michel’)、「絲蕉」(‘Silk’) 和「馬尼拉麻」(‘Abaca’) 等品種；「稜指蕉」(‘Bluggoe’) 為第二生理小種之主要宿主；第三生理小種感染赫蕉系 (Heliconia)；而第四生理小種則以華蕉系 (Cavendish) 等亞洲主要栽培品種為宿主，亦造

投稿日期：2017 年 5 月 22 日；接受日期：2017 年 10 月 23 日。

\* 通訊作者：swaychen@tari.gov.tw

<sup>1</sup> 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。

<sup>2</sup> 農委會農業試驗所生物技術組研究助理。台灣 台中市。

<sup>3</sup> 前中央研究院植物暨微生物學研究所研究員。台灣 台北市。

<sup>4</sup> 農委會農業試驗所生物技術組研究員兼組長。台灣 台中市。

成嚴重危害 (Sun & Huang 1996)。

近年來的研究顯示，由甜椒 (*Capsicum annuum* L.) 選殖出的植物類鐵氧化還原蛋白 (plant ferredoxin-like protein; PFLP)，在植物遭受病原菌感染時所產生的過敏反應 (hypersensitive response; HR) 中扮演重要角色 (Dayakar *et al.* 2003)。研究顯示，PFLP 具有促進植物受感染細胞中活性氧化物 (reactive oxygen species; ROS) 累積和過敏反應的功能 (Dayakar *et al.* 2003)。Tang *et al.* (2001) 的研究顯示，於水稻中表現分離自甜椒的 PFLP 基因，可強化水稻轉殖系對 *Xanthomonas* 的抗病能力；而 PFLP 過量表現之阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*) 轉殖系接種細菌性軟腐病後，亦顯示轉殖系能提升對軟腐病的抗性 (Su *et al.* 2014)。胞外分泌訊號胜肽 (extracellular secretion signal peptide; esp) 為一段位於蛋白質 N-terminal 的胺基酸序列，具有幫助於細胞內摺疊、修飾完畢之完整功能的蛋白質經由囊泡分泌至胞外之功能。Outchkourov *et al.* (2002) 將 equistatin 蛋白基因序列 N-terminal 加上一段  $\alpha$ -mating factor secretion signal 序列進行修飾，結果顯示該段修飾過的融合蛋白與未修飾之 equistatin 蛋白比較，能提高 20 倍以上的蛋白質累積量。內質網保留訊號 (endoplasmic reticulum retention signal) 為一段由 Lys-Asp-Glu-Leu 四個胺基酸分子所組成之胺基酸序列 (胺基酸序列縮寫為 KDEL)，C-terminal 帶有 KDEL 序列的蛋白質可在完成摺疊與修飾後再次運移至內質網 (Stornaiuolo *et al.* 2003)。Wandelt *et al.*

(1992) 將碗豆球蛋白基因加上 KDEL 序列，並導入菸草及苜蓿等植物中表現，可見轉殖系中帶有 KDEL 序列之碗豆重組球蛋白累積量為未修飾的碗豆球蛋白的 20–100 倍，顯示 KDEL 序列對蛋白質之運移、穩定構形及儲存具有重要作用。

本研究嘗試建立香蕉黃葉病快速篩選流程，並以此篩選系統評估香蕉之抗病能力。研究內容包含：確認病原菌之病原性、接種方法與條件、黃葉病發病指標、發病時間等，藉此探討於香蕉中表現 PFLP 基因是否能增加轉殖系對於黃葉病之耐性或抗性，並比較未修飾的 PFLP 蛋白與帶有 esp 及 KDEL 序列之修飾 PFLP 蛋白對黃葉病抗性能力之差異。

## 材料方法

### 植物材料

本試驗所使用之基改香蕉材料為表現未修飾 PFLP 蛋白之 MVES-3、MVES-4、MVCS-6、MVCS-20 轉殖系，以及表現 esp 與 KDEL 修飾之 PFLP 蛋白的 MCPER-3-3、MCPER-3-4 轉殖系 (圖 1)，香蕉轉殖系植物材料均由中央研究院馮騰永研究員所提供。轉殖載體構築方式如 Dayakar *et al.* (2003) 所述，轉殖系能穩定表現 *pflp* 外源基因，並對黃葉病原 *Foc race 4* 具有抗性 (Yip *et al.* 2011)。本試驗另以 'Gros Michel' 作為未轉殖 (WT) 之對照品系。本試驗所使用的香蕉苗均經組培繼代後，挑選大小一致之瓶

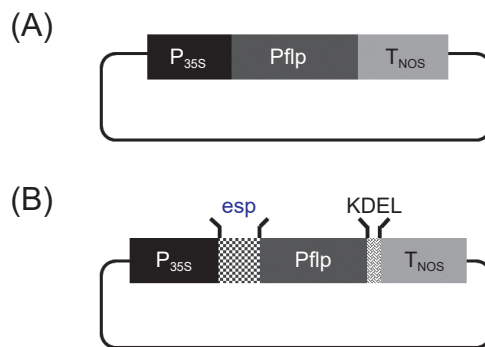


圖 1. (A) Plant ferredoxin-like protein (PFLP) 與 (B) MCPER 重組載體構築示意圖。esp 為胞外分泌訊號胜肽；KDEL 為內質網保留訊號。

**Fig. 1.** Construction of the recombinant plasmid (A) plant ferredoxin-like protein (PFLP) and (B) MCPER. esp, extra cellular secretion signal; and KDEL, endoplasmic reticulum retention signal.

苗，培養於 B3 固態培養基 (1/2 MS salts, 340 mg L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 160 mg L<sup>-1</sup> adenine sulfate, 3% sucrose, pH 5.5, 0.7% agar)，25°C ± 2°C、12 h 光照環境，待培植體發根後出瓶，小苗定植後置於隔離溫室馴化。試驗前蕉苗均以聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR) 檢測是否帶有外源基因，植物基因體 DNA 的萃取是使用 Plant Genomic DNA Purification Kit (PROTECH, Taiwan)，萃取方法依原廠手冊建議。確認帶有外源基因之香蕉轉殖系，於出瓶後 5 wk 後挑選整齊一致的植株進行後續接種試驗。

### 接種方法與條件

Foc 接種試驗參考 Twizeyimana *et al.* (2007) 及 Tripathi *et al.* (2008) 的接種方式，Foc 病原菌 (TBRI-3) 則取自財團法人台灣香蕉研究所 (Taiwan Banana Research Institute; TBRI)。Foc 之繼代培養使用 Difco™ Potato Dextrose Agar (Difco Laboratories, MI) 培養基，栽培介質培養方式為：Foc 菌塊於 Difco™ Potato Dextrose Broth (Difco Laboratories, MI) 液態搖盪培養 1 wk (28°C, 800×g) 後以 Cheese cloth 過濾去除菌絲，並搜集過濾後孢子液。利用離心法去除培養基。使用無菌水回溶孢子，並利用血球計數器計算孢子濃度，調整孢子液至試驗濃度 10<sup>6</sup> spores mL<sup>-1</sup>。所有栽培介質皆經高溫高壓滅菌處理 (121°C, 20 min)，混合比例為根基旺：玉米粉：Foc 孢子濃度 10<sup>6</sup> spores mL<sup>-1</sup> = 2,500：131：500 (mL) 後密封，於 28°C 培養 1 mo。將培養 1 mo 之菌土：無菌根基旺 = 1：3 混合後使用。接種時，將香蕉幼苗移植至栽培介質中，培養於溫室 (溫度 25–28°C)，每個處理之香蕉品種為 5 株，並含有未處理之對照組，重複試驗至少 3 次。為避免 Foc 於土壤中的含量因環境因素或隨時間逐漸減少，於香蕉接種黃葉病菌 7 d 後，每週於栽培介質中加入一次 20 mL pot<sup>-1</sup> 之 10<sup>7</sup> spores mL<sup>-1</sup> 之 Foc 懸浮液，並在 1 wk 內澆灌適量的逆滲透 (reverse osmosis; RO) 水 3 次。

### 黃葉病之病徵判斷

本試驗所使用的香蕉黃葉病的病徵判斷方法，包括黃葉率、罹病指數以及假莖褐化率，判定方式分述如下：

$$\text{黃葉率} = \frac{\text{葉片黃化數}}{\text{全株葉片數}} \times 100\%$$

罹病嚴重程度 (disease severity index; DSI)，判定標準與分級如表 1 所列。

$$\begin{aligned} &\text{假莖褐化率 (corm discoloration \%)} \\ &= \frac{\text{假莖切面褐化面積}}{\text{假莖切面總面積}} \times 100\% \end{aligned}$$

香蕉假莖褐化率材料取樣自試驗 54 d 後之蕉苗假莖基部，拍攝假莖縱剖面照片，並利用 Image J 軟體 (<http://imagej.nih.gov/ij/>) 分析切面總面積與褐化面積。

## 結果與討論

### 接種用香蕉轉殖株分子驗證

以 PCR 檢測擬轉殖株 MVES-3、MVES-4、MVES-7、MVCS-6、MVCS-20 以及 MCPER-3-3、MCPER-3-4 基因組是否帶有外源基因，表 2 為檢測外源基因 P<sub>35S</sub>::*pftp*::T<sub>nos</sub> 及 P<sub>35S</sub>::*MCPER*::T<sub>nos</sub> 所使用的引子對。結果顯示，圖 2A 中 MVES-3、MVES-4、MVES-7 以及 MVCS-6、MVCS-20 轉殖系，皆有 545 bp 之目標基因條帶檢出。圖 2B 為 MCPER-3-3 與 MCPER-3-4，亦檢測出 844 bp 之目標片段，“W” 為不帶有模板 DNA 之空白試驗對照組；“-” 為未轉殖 ‘Gros Michel’ 香蕉負對照組；“+” 則為帶有 PFLP 基因之質體 DNA 正處理組。結果顯示轉殖株 MVES-3、MVES-4、MVES-7、MVCS-6、MVCS-20、MCPER-3-3、MCPER-3-4 之 PCR 結果與正處理

表 1. 黃葉病之罹病指標說明。

Table 1. Disease severity index (DSI) of *Fusarium* wilt disease.

Score	Appearance
0	No visible symptoms
1	0–1/4 leaves wilted or yellowed
2	1/4–1/3 leaves wilted or yellowed
3	1/3–1/2 leaves wilted or yellowed
4	1/2–3/4 leaves wilted or yellowed
5	All leaves wilted/plant dead

表 2. 聚合酶連鎖反應使用的引子對序列與產物片段大小。

Table 2. Primer sequence and target size of polymerase chain reaction.

Construct	Event	Primer seq.	Target size (bp)
$P_{35S}::pflp::T_{nos}$	MVES-3, MVES-4, MVES-7, MVCS-6, MVCS-20	5'-aagggatgacgcacaatcccactatccttc-3' 5'-cgagctcgttagcccacgagttctgtctct3'	545
$P_{35S}::MCPER::T_{nos}$	MCPER-3-3, MCPER-3-4	5'-aagggatgacgcacaatcccactatccttc-3' 5'-cccagtcacgacgtgtgaaa-3'	844

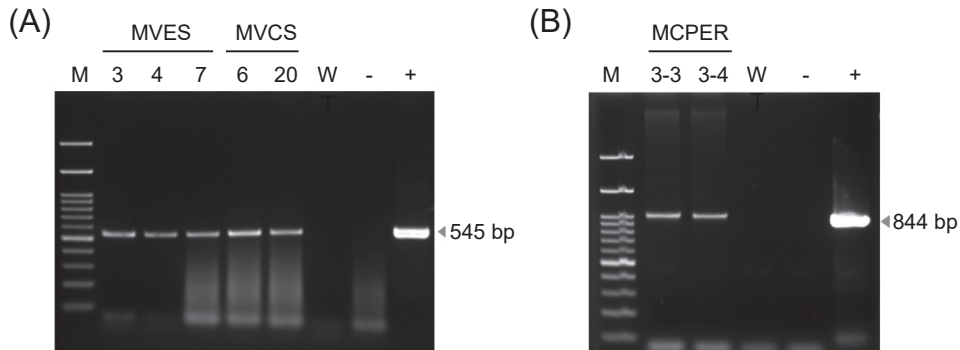


圖 2. 箭號標示處為目標片段大小。Lane M 為 marker，Lane W 為沒有加入 DNA 的空白對照組，Lane - 為負控制組的未轉殖 'Gros Michel' 基因組 DNA，Lane + 則為帶有 *pflp* 基因片段的正控制組，轉殖系 MVES-3、MVES-4、MVES-7、MVCS-6、MVCS-20、MCPER-3-3、MCPER-3-4 依序標示於圖上。

Fig. 2. Foreign gene detection of transgenic banana lines *pflp* (A) and MCPER (B). Arrows showed the target size. Lane M, DNA ladder marker; Lane W, the blank control without any DNA templates in the PCR reactions; Lane "-": non-transgenic 'Gros Michel' gDNA as negative control; and Lane "+": plasmid DNA with *pflp* gene fragment as positive control. Lane 3: MVES-3; Lane 4: MVES-4; Lane 7: MVES-7; Lane 6: MVCS-6; Lane 20: MVCS-20; Lane 3-3: MCPER-3-3; and Lane 3-4: MCPER-3-4.

組具有相同片段大小條帶，確定參試之香蕉苗均帶有目標基因。

### 香蕉轉殖株對黃葉病之抗性檢測

參試香蕉品系移植入帶有黃葉病原菌之土壤中進行接種，以評估各品系香蕉對於黃葉病之抗性。圖 3 為接種後 54 d 後之植株於溫室生長情形，轉殖系 MCPER-3-4 植株不具明顯病徵，且生長狀態良好，其餘香蕉植株除生長較緩慢、植株生長勢較弱外，亦出現葉片黃化、萎凋等情形。圖 4A 為調查香蕉各處理組的葉片黃化率。結果顯示，MCPER-3-4 香蕉植株之葉片黃化率 10%，遠低於其他轉殖系，且已達 5% 顯著水準，具有顯著差異。感病率第二低的則為 MCPER-3-3 轉殖株 (黃化率 30%)，但與其他轉殖系均未達顯著水準。另以罹病嚴重程度 (Disease severity index; DSI) 統計感病

率，圖 4B 顯示 MCPER-3-3 於接種後 32 d DSI 開始輕微上升，接種後 46 d DSI 開始明顯上升；MCPER-3-4 於接種後 37 d 後檢測到 DSI 的上升，於 46 d 至 54 d 期間則無明顯 DSI 變化，其餘轉殖株則於接種後 32 d 開始出現大量病徵，致 DSI 急遽上升，DSI 檢測結果與葉片黃化比率相符。比較兩者並經檢測感病情形，最輕微者皆為轉殖系 MCPER-3-4。檢測香蕉假莖之褐化率，比較接種處理組之假莖縱切面 (圖 5)，顯示 MCPER-3-4 具有較低之假莖褐化率 (30.22%)，其餘依次為 MVCS-6 (33.68%)、MVES-4 (35.42%)、MCPER-3-3 (39.66%)、MVES-7 (40.43%)、V215 (41.44%)、MVES-3 (53.77%)，假莖褐化率最高者為 MVCS-20 (64.52%) (表 3)。

PFLP 蛋白參與光合作用，其 N-terminal 具有可使 PFLP 蛋白質運移至葉綠體之訊號肽。

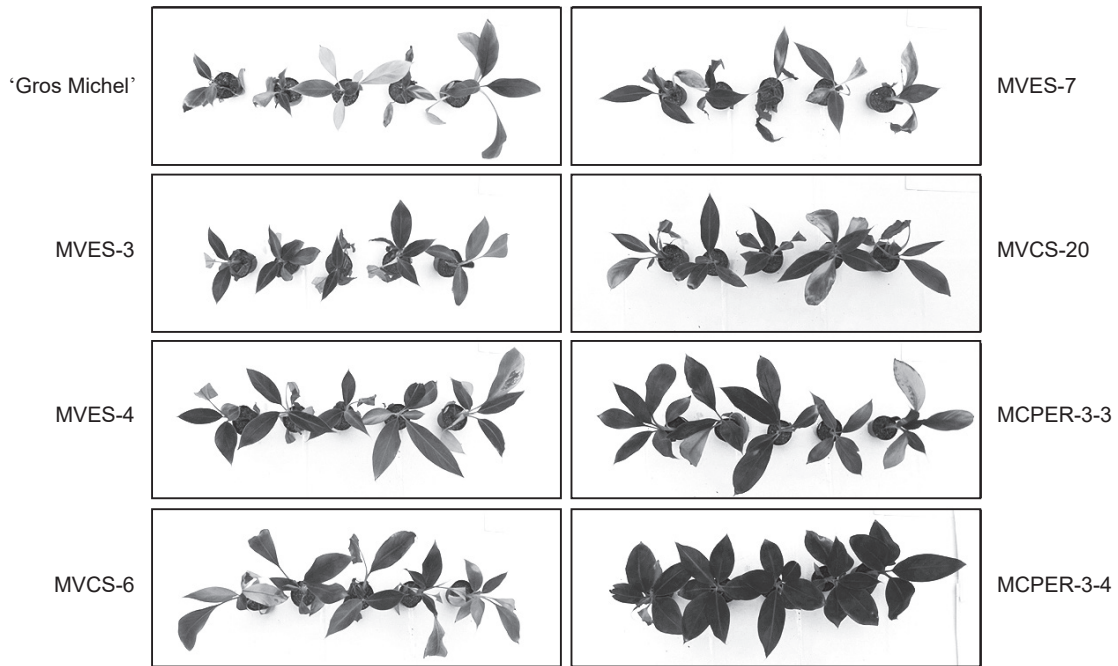


圖3. 參試品種對 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) 耐受性評估。以 'Gros Michel' 作為未轉殖對照品系，與轉殖系 MVES-3、MVES-4、MVES-7、MVCS-6、MVCS-20、MCPER-3-3、MCPER-3-4 皆於接種後 54 d 進行照片拍攝。

Fig. 3. *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) disease tolerance of different banana lines. Non-transgenic 'Gros Michel' and transgenic lines MVES-3, MVES-4, MVES-7, MVCS-6, MVCS-20, MCPER-3-3, and MCPER-3-4 were inoculated in greenhouse condition. Photos were taken at 54 d post inoculation.

表3. 香蕉轉殖系與未轉殖品系接種 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) 後假莖褐化率。

Table 3. Discoloration level of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) inoculated non-transgenic and transgenic banana lines.

Line	Discoloration (%) <sup>z</sup>
'Gros Michel' (WT)	41.44 ± 25.84 abc
MVES-3	53.77 ± 14.00 ab
MVES-4	35.42 ± 17.36 bc
MVES-7	40.43 ± 23.18 bc
MVCS-6	33.68 ± 8.36 bc
MVCS-20	64.52 ± 25.00 a
MCPER-3-3	39.66 ± 8.61 bc
MCPER-3-4	30.22 ± 11.99 c

<sup>z</sup> Discolored region and total area of corm were determined by Image J. Percentage of discolored area = (discolored region/total corm area) × 100%. Mean ± standard error (n = 5). Means followed by the same letter within each column are not significantly different at 5% level by least significant difference (LSD) test.

前人研究結果顯示，去除 PFLP N-terminal 之葉綠體訊號勝肽，能夠於細胞質中檢測到大量 PFLP 之累積，並且同樣地具有抗菌效果 (Huang *et al.* 2006)。Lin *et al.* (2010) 分別構築去除 PFLP N-terminal 葉綠體訊號勝肽之 PFLP 過量表現質體 (*d-pflp*)；帶有葉綠體訊號勝肽之 PFLP 過量表現質體 (*csp-pflp*)；以及 N-terminal 帶有胞外分泌訊號勝肽之 PFLP 過量表現質體 (*esp-pflp*)，再將上述三質體透過農桿菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 基因轉殖分別導入阿拉伯芥基因組中。結果顯示，*esp-pflp* 阿拉伯芥轉殖株於接種 *Ralstonia solanacearum* 病原菌後，其罹病指標低於未轉殖株及其他轉殖株，且過敏反應檢測結果亦顯示 *esp-pflp* 轉殖株具有較高之過敏反應。經由葉片黃化率和罹病嚴重指數之統計結果顯示，MCPER-3-4 轉殖株對黃葉病有明顯的抗性，具有成為抗黃葉病之香蕉品種的潛力，其次為由同一轉殖母株分離之 MCPER-3-3 轉殖

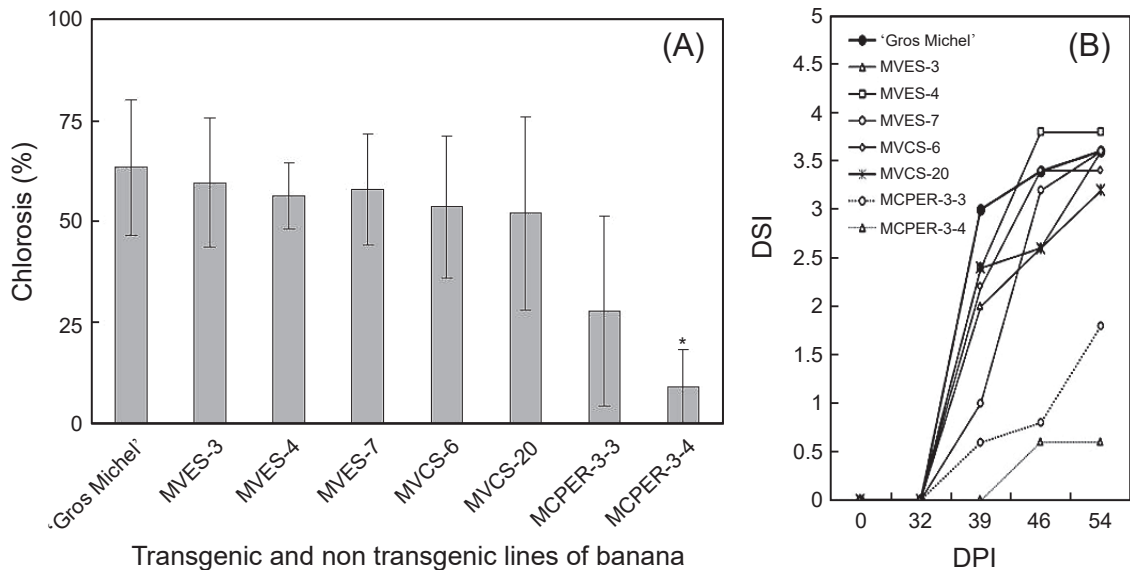


圖 4. 各轉殖系及未轉殖香蕉黃葉率與罹病嚴重程度。(A) 各品系香蕉植株黃葉率 (54 dpi)。資料經由 ANOVA 和 Tukey's test 計算後具顯著性差異則標示 \* ( $\alpha = 0.05$ )，試驗進行 5 重複；(B) 各品系香蕉罹病嚴重程度 (Disease severity index; DSI)，調查於接種後第 0、32、39、46 與 54 d。

**Fig. 4.** Percentage of chlorosis leaves and disease severity index of different transgenic and non transgenic line of bananas. (A) Percentage of yellowing leaves per seedlings were estimated at 54 dpi. Data were analyzed by one-way ANOVA and Tukey's test. Group with star represents a statistically significant difference among them ( $\alpha = 0.05$ ); (B) Disease severity index (DSI) of different transgenic and non-transgenic line of bananas were estimated at 0, 32, 39, 46, and 54 d.

株。另 MVES-4 和 MVCS-6 轉殖株接種後 54 d 之葉片黃化率分別為 MVES-4 57%、MVCS-6 55%，略低於未轉殖株但無顯著差異。由此顯示，於 PFLP 基因的 N-terminal 及 C-terminal 分別接上 esp 和 KDEL 序列之 CPER 轉殖系，確實提高了轉殖株的抗病性，且與未轉殖株具顯著差異；然而 CPER 轉殖系之高抗病能力是否與 PFLP 蛋白質的穩定度和表現量有關，仍須進一步的比較 PFLP 轉殖系與 CREP 轉殖系中 PFLP 基因表現量及蛋白質含量與轉殖株感病性之相關性。假莖褐化率檢測結果與葉片黃化率及罹病嚴重指數不符，假莖褐化率最低之轉殖株為 MCPER-3-4 (30.22%)，其次為 MVCS-6 轉殖株 (33.68%)。然而，葉片黃化率最低者，同樣為 MCPER-3-4，其次卻為 MCPER-3-3 轉殖株，顯示假莖褐化率與葉片黃化率兩檢測方法之結果不具直接相關性。推測可能原因，為檢測樣本數量不足。另也必須延長接種時間，讓

受黃葉病感染之香蕉植株，其假莖褐化情形能夠有足夠時間反應至地上部的葉片上，使得葉片黃化與假莖褐化出現較為一致的結果。

## 結論

利用接種黃葉病病原篩選轉殖系香蕉試驗，同時比較基因轉殖香蕉與非轉殖香蕉，綜合使用黃葉率、罹病率分析及假莖褐化率等做評估，顯示具表現 PFLP 香蕉，與帶有 *esp-pflp* 融合蛋白之轉殖系，具有較佳之抗黃葉病能力，未來仍將以田間抗病的長期觀察做進一步驗證。

## 誌謝

本研究承蒙行政院農業委員會科技計畫 (103-104 農科-6.3.2-農-C1) 經費支援，以及中研院馮騰永研究員提供香蕉轉殖系作為試驗材料，謹此致謝。

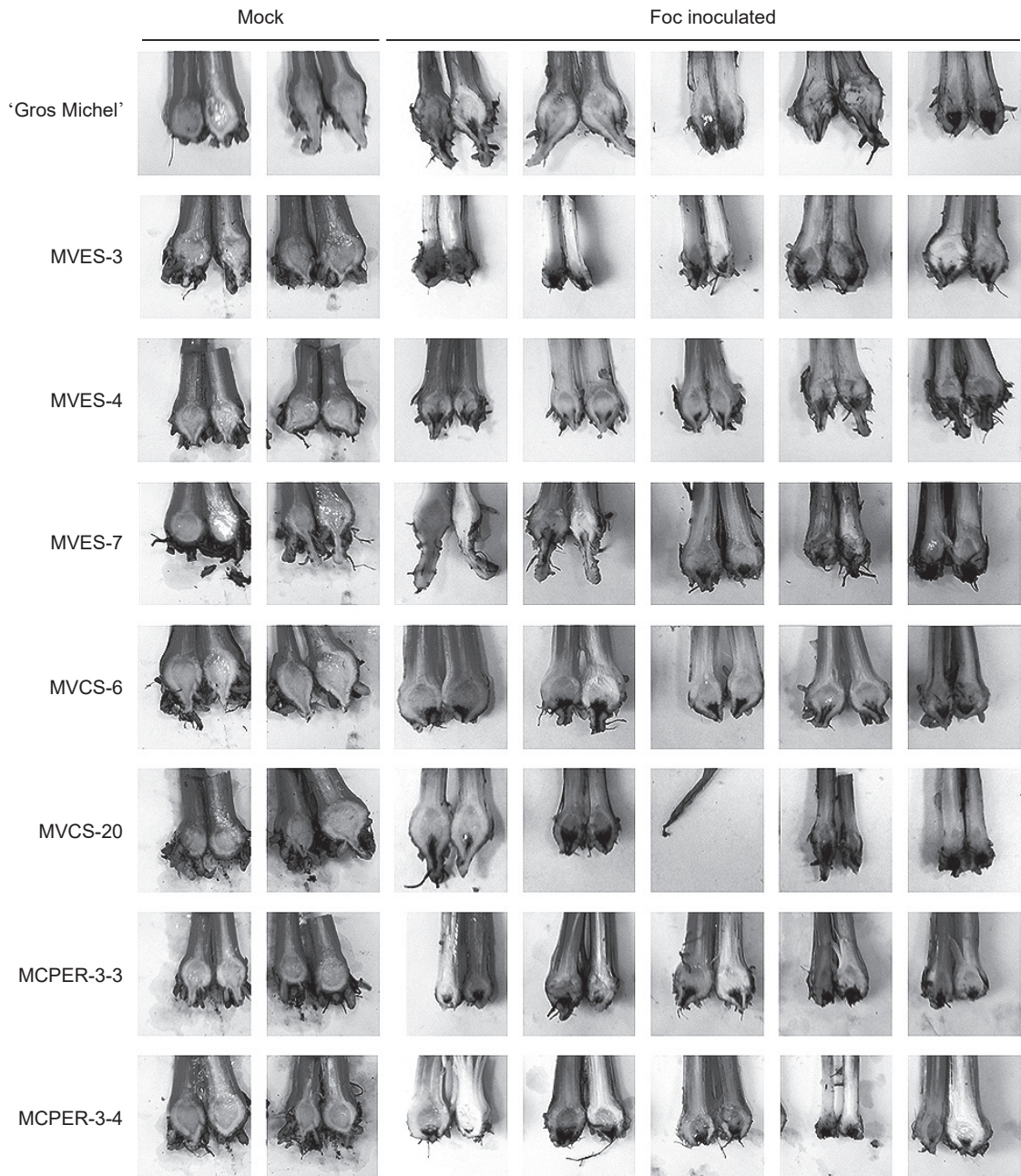


圖 5. 不同香蕉品系假莖縱切檢測。以 'Gros Michel' 作為未轉殖對照品系，與轉殖系 MVES-3、MVES-4、MVES-7、MVCS-6、MVCS-20、MCPER-3-3、MCPER-3-4，分別接種沒有 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cabense* (Foc) 孢子的純水 (mock)，與孢子懸浮液，並於接種後 54 d 進行照片拍攝。

**Fig. 5.** The symptoms of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cabense* (Foc) inoculation in different banana lines. Non-transgenic 'Gros Michel' and transgenic lines MVES-3, MVES-4, MVES-7, MVCS-6, MVCS-20, MCPER-3-3, and MCPER-3-4 were inoculated with Foc free water (mock) or Foc spore suspension in greenhouse condition. Images of cross-section were recorded at 54 d post inoculation.

## 引用文獻

- Daniells, J. W. 2009. Global banana disease management-Getting serious with sustainability and food security. *Acta Hort.* 828:411–416.
- Dayakar, B. V., H. J. Lin, C. H. Chen, M. J. Ger, B. H. Lee, C. H. Pai, D. Chow, H. E. Huang, S. Y. Hwang, M. C. Chung, and T. Y. Feng. 2003. Ferredoxin from sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) intensifying harpin (PSS)-mediated hypersensitive response shows an enhanced production of active oxygen species (AOS). *Plant Mol. Biol.* 51:913–924.
- Huang, H. E., M. J. Ger, C. Y. Chen, M. K. Yip, M. C. Chung, and T. Y. Feng. 2006. Plant ferredoxin-like protein (PFLP) exhibits an anti-microbial ability against soft-rot pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* *in vitro* and *in vivo*. *Plant Sci.* 171:17–23.
- Lin, Y. H., H. E. Huang, F. S. Wu, M. J. Ger, P. L. Liao, Y. R. Chen, K. C. Tzeng, and T. Y. Feng. 2010. Plant ferredoxin-like protein (PFLP) outside chloroplasts in *Arabidopsis* enhances disease resistance against bacterial pathogens. *Plant Sci.* 179:450–458.
- Outchkourov, N. S., W. J. Stiekema, and M. A. Jongsma. 2002. Optimization of the expression of equistatin in *Pichia pastoris*. *Protein Exp. Purif.* 24:18–24.
- Smith, S. N. 2007. An overview of ecological and habitat aspects in the genus *Fusarium* with special emphasis on the soil borne pathogenic forms. *Plant Pathol. Bull.* 16:97–120.
- Stornaiuolo, M., L. V. Lotti, N. Borgese, M. R. Torrisi, G. Mottola, G. Martire, and S. Bonatti. 2003. KDEL and KKXX retrieval signals appended to the same reporter protein determine different trafficking between endoplasmic reticulum intermediate compartment and Golgi complex. *Mol. Biol. Cell* 14:889–902.
- Sun, S. G. and J. W. Huang. 1996. *Plant Disease Caused by Fusarium in Taiwan*. Shih Wei Press. Taichung, Taiwan. 170 pp. (in Chinese)
- Su, Y. H., C. Y. Hong, and Y. H. Lin. 2014. Plant ferredoxin-like protein enhances resistance to bacterial soft rot disease through PAMP-triggered immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Eur. J. Plant Pathol.* 140:377–384.
- Tang, K., X. Sun, Q. Hu, A. Wu, C. H. Lin, H. J. Lin, R. M. Twyman, P. Christou, and T. Feng. 2001. Transgenic rice plants expressing the ferredoxin-like protein (AP1) from sweet pepper show enhanced resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Plant Sci.* 160:1035–1042.
- Tripathi, L., J. Odipio, J. N. Tripathi, and G. Tusiime. 2008. A rapid technique for screening banana cultivars for resistance to *Xanthomonas* wilt. *Eur. J. Plant Pathol.* 121:9–19.
- Twizeyimana, M., P. S. Ojiambo, A. Tenkouano, T. Ikontun, and R. Bandyopadhyay. 2007. Rapid screening of *Musa* species for resistance to black leaf streak using *in vitro* plantlets in tubes and detached leaves. *Plant Dis.* 91:308–314.
- Wandelt, C. I., M. R. I. Khan, S. Craig, H. E. Schroeder, D. Spencer, and T. J. V. Higgins. 1992. Vicilin with carboxy-terminal KDEL is retained in the endoplasmic reticulum and accumulates to high levels in the leaves of transgenic plants. *Plant J.* 2:181–192.
- Yip, M. K., S. W. Lee, K. C. Su, Y. H. Lin, T. Y. Chen, and T. Y. Feng. 2011. An easy and efficient protocol in the production of pflp transgenic banana against *Fusarium* wilt. *Plant Biotechnol. Rep.* 5:245–254.

# Improving Resistance to *Fusarium* Wilt Disease in PFLP Transgenic Bananas

Cheng-Ping Kuan<sup>1</sup>, Po-Heng Chen<sup>2</sup>, Han-Wei Chen<sup>1\*</sup>, Teng-Yung Feng<sup>3</sup>, and Tso-Chi Yang<sup>4</sup>

## Abstract

Kuan, C. P., P. H. Chen, H. W. Chen, T. Y. Feng, and T. C. Yang. 2018. Improving resistance to *Fusarium* wilt disease in PFLP transgenic bananas. *J. Taiwan Agric. Res.* 67(2):209–217.

*Fusarium* wilt disease of banana (Panama disease), caused by *Fusarium oxysporium* f. sp. *cubense* (Foc), is considered as one of the most important banana diseases in the world and no chemical control or fungicides are available so far. To decrease the damages of *Fusarium* wilt on banana industry, planting resistant cultivars and breeding the transgenic bananas expressing resistant genes against pathogens are best strategy in the Foc-infected field. Here, we developed a foliar rating system to assess the disease-development of *Fusarium* wilt in several transgenic banana plants expressing the ferredoxin-like protein (PFLP) gene. The responses of the PFLP transgenic and non-transgenic banana cultivars were evaluated on their susceptibility or tolerance against the pathogen in pots in the greenhouse. The PFLP gene in transgenic bananas were monitored by PCR to confirm its existence. Several transgenic lines of plantlets were challenged by the infection with the conidia suspension of Foc. Leaves yellowing or wilting symptoms of banana seedlings appeared over 8 weeks after Foc-inoculation. The results showed that the ‘MCPER3-4’ was the more resistant line among seven transgenic lines. This fast and space-effective bioassay may be used to evaluate as screening of *Musa* spp. against the disease.

**Key words:** Banana, *Fusarium* wilt, Panama disease, Tolerance.

---

Received: May 22, 2017; Accepted: October 23, 2017.

\* Corresponding author, e-mail: swaychen@tari.gov.tw

<sup>1</sup> Assistant Research Fellows, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>2</sup> Research Assistant, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>3</sup> Former Research Fellow, Institute of Plant and Microbial Biology, Academia Sinica, Taipei, Taiwan, ROC.

<sup>4</sup> Research Fellow and Director, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.