

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

文心蘭假球莖之養分儲存與開花品質及產期相關功能性基
因體分析(2/2)

計畫類別：整合型計畫

計畫編號：NSC92-2317-B-002-006-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：國立臺灣大學植物科學研究所

計畫主持人：葉開溫

共同主持人：徐源泰

報告類型：完整報告

報告附件：赴大陸地區研究心得報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 1 月 12 日

一 中文摘要

爲了探討文心蘭(*Oncidium Gower Ramsey*)在花梗發育過程中，養分儲存與開花品質及產期相關功能性基因體分析，利用 cDNA 微陣列和扣除式 EST 文庫研究了在花梗發育初期（花梗長度 2–4cm）假球莖中特異表現的基因：在扣除式 EST 文庫中選出 14 個與碳水化合物，包括蔗糖、澱粉、甘露糖及果膠，代謝相關基因以北方墨漬法分析表現，其中 13 個於假球莖中會大量表現，推測出文心蘭假球莖在花序發育過程中可能先以甘露聚糖後以澱粉的形式貯存累積。在扣除式 EST 文庫中也發現 class III peroxidase(POXs)會大量表現，並從文心蘭 cDNA 文庫中，找出了 11 條 POXs 基因。現正著手將這些 POXs 基因轉植到阿拉伯芥與文心蘭中，進而研究它們於花序發育生理功能的作用與影響。

關鍵詞：文心蘭、扣除基因庫、微陣列晶片

Abstract:

The investigation of nutrient storage, floral quality and floral time in *Oncidium Gower Ramsey* pseudobulb during the development of flower stalk were carried out. At the initiation of flower stalk (length 2-4 cm), more than 1000 pseudobulb specific expressed genes were discovered using cDNA microarray and subtractive EST library; The Northern blot analysis of fourteen cDNA in the subtractive EST library related to carbohydrate metabolism group confirm that thirteen cDNA have higher expression level in pseudobulb, suggesting mucilage may be formed first and then transferred to starch during the development of flower stalk. We also found that class III peroxidase (POXs) were highly expressed in the subtractive EST library and obtained eleven POXs genes form *Oncidium* cDNA library. Now these POXs genes have been transformed to *Arabidopsis* and *Oncidium* plants to observe their effects on inflorescence and flower development.

Keywords: *Oncidium*、subtractive library、cDNA microarray

二計畫緣由與目的

文心蘭(*Oncidium*)爲台灣第三大外銷切花(黃等人, 1998)，其中蘭西品系(*Oncidium Gower Ramsey*)是主要的切花品種。假球莖是儲藏水分及養分的主要器官(Stern and Morris, 1992 ; Zheng et al., 1992, Hew and Yong, 1994))，其數目對花序的產量及品質有高度相關(Zimmerman, 1990, Wadasinghe and Hew, 1995)，而其中所含的碳水化合物除了可以提供養分外，也可能在開花起始階段扮演重要角色(Bernier et al., 1993 ; Hew and Yong, 1994)。

研究發現(葉開溫, 2002)，花序發育初期(花梗長度小於 3 公分)，假球莖乾重的 1/10 爲黏質物(mucilage)，而其中 96%的單醣成分是甘露醣(mannose)。隨著花梗的抽長，黏質物與六碳醣(主要爲葡萄糖與果糖)含量逐漸減少而澱粉逐漸累積。當

花序完全展開，假球莖內澱粉濃度的減少並未伴隨六碳糖濃度的增加，而自由態甘露糖雖有增加，但仍不及葡萄糖的 1/10。由以上的研究可知花序品質與假球莖有密切的相關。

文心蘭雖全年開花，但產值及品質隨著季節變動，尤其以月之間，量多品質差；相對的冬、春兩計量少品質佳(許玉妹，1999)。產業上雖花農致力於栽培管理上的改進，但仍不能滿意的是條控花期及品質，而學術上目前針對文心蘭開花生哩，雖有些許研究，但分子機制層面則極少研究。

實驗中選擇花序長 3 公分的假球莖扣減掉葉子所製成扣除基因庫(subtractive library)，接著製造微陣列晶片(cDNA microarray)尋找文心蘭蘭西品系花序發育時期於假球莖中具有差異表現的基因，並定序個基因，由基因表現序列標記(EST, Expression sequence Tags)，尋找於花序發育初期於假球莖中專一表現的基因。將這些基因與已知基因比對推測其於花序發育初期的假球莖有何功能。

三.結果與討論

利用 3 公分的假球莖扣減掉葉子製備扣減式基因庫，經定序獲得 1080 條序列，將重複者整理成群共獲 712 種序列。經 BlastX 比對，與已知蛋白質序列相似度較高者有 484 個，其中並有許多與碳水化合物代謝相關的基因，利用 ruthenium red 及碘液染假球莖中的黏質物及澱粉，結果花序發育初期的假球莖富含黏質物，隨著花序發育黏質物漸減，而澱粉含量則漸增，並於花序盛開前含量最高。接著於扣減式基因庫選出 14 個與碳水化合物，包括蔗糖、澱粉、甘露糖及果膠，代謝相關基因以北方墨漬法分析表現，其中 13 個於假球莖中會大量表現。根據生理及基因表現研究結果，推測出文心蘭假球莖在花序發育過程中可能先以甘露聚糖後以澱粉的形式貯存累積。並自扣減式基因庫中選出與 β -mannosidase 相似的 2 個基因片段，選殖出文心蘭假球莖內 *OrMside1~4* 基因全長，其核苷酸長度為 1700、1669、1639、1578bp，最後著相似度較低(47%)。北方墨漬法分析 *OrMside1* 於花序發育後期表現量較高，*OrMside14* 於花序發育前期表現量較高。

此外在扣減式 EST 文庫中也發現 class III peroxidase(POXs)會大量表現，並從文心蘭 cDNA 文庫中，找出了 11 條 POXs 基因。現正著手將這些 POXs 基因轉植到阿拉伯芥與文心蘭中，進而研究它們於花序發育生理功能的作用與影響。

四.計畫成果自評

(a) 是否達成預定成效。

以按照實驗計畫完成 subtractive library 及 cDNA microarray，目前正進行基因相關生理研究。

(b) 成果的學術價值(如是可否發表於學術期刊)

文心蘭雖為重要經濟作物，但有關文心蘭開花機制多集中於生理與栽培技術上的探討，就基因方面的探討較少，因此本計畫可對開花分生機制有更深入的了解，將可發表於國際上之學術期刊

(c) 成果的應用價值(如是否可申請專利)

對開花相關機制有深入的了解，可幫助文心蘭切花產業產期及產量的調節。對於特殊有用基因，將有申請專利保護之必要。

(d) 可否轉申請研發應用計畫(主要針對一般重點領域計畫)

可能需等待聚差異性表現基因功能性研究完成後，方可判斷是否有繼續深的研究的潛力

(e) 技術轉移程度：廠商是否承接此技術；進一步有商業化產品(主要針對研發應用計畫)

目前尚在學術研究階段，還需要更深入的研究才有技術轉移之可能。

伍. 參考文獻

- [1] Coruzzi GM and Zhou L. Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: emerging martrix effect. *Curr Opin Plant Biol.* 2001 Jun, 4(3) : 247-53.
- [2] Moller IM. A new draw for plant mitochondrial NAD(P)H dehydrogenases. *Trends plant Sci.* 2002 Jun 7(6) : 235-7
- [3] Verwoert II, van der Linden KH, Nijkamp HJ, Stuitje AR. Developmental specific expression and organelle targeting of the *Escherichia coli* fabD gene, encoding malonyl coenzyme A-acyl carrier protein transacylase in transgenic rape and tobacco seeds. *Plant Mol BIOL.* 1994 Oct : 26(1): 189-202.
- [4] Fray RG, Wallace A, Grierson D, Lycett GM. Nucleotide sequence and expression of a ripening and water stress-related cDNA from tomato with homology to the MIP class of membrane channel proteins. *Plant Mol BIOL.* 1994 Fed; 24(3):539-43

- [5] Mathesius U. Flavonoids induced in cells undergoing nodule organogenesis in white clover are regulators of auxin breakdown by peroxidase. *J Exp Bot.* 2001 Mar;52 (Spec Issue):419-26
- [6] Lokhande SD, Ogawa K, Tanaka A, Hara T. Effect of temperature on ascorbate peroxidase activity and flowering of *Arabidopsis thaliana* ecotype under different light conditions. *J Plant Physiol.* 2003 Jan;160(1):57-64.