

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

文心蘭功能性基因組研究--文心蘭假球莖中與開花生理相關基因之功能性研究(3/3) 研究成果報告(完整版)

計畫類別：整合型
計畫編號：NSC 95-2317-B-002-005-
執行期間：95年08月01日至96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

計畫參與人員：學士級-專任助理：潘信鉸
博士後研究：賴曼拉
博士班：邱崇益、沈金輝
碩士班：謝懿風

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 97年01月02日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

文心蘭功能性基因組研究--文心蘭功能性基因組研究-文心蘭假球莖中與開花
生理相關基因之功能性研究

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 96-2317-B-002-018

執行期間：2007年8月1日至2008年12月31日

計畫主持人：葉開溫

共同主持人：楊長賢、鄭石通

計畫參與人員：賴曼拉(博士後)、潘信鉸(助理)、邱崇益(博士班)、沈金輝(博士班)、謝懿風(碩士班)

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：台灣大學植物科學研究所

中華民國 96 年 12 月 23 日

(一)前言

文心蘭 (*Oncidium*) 原生於熱帶、亞熱帶美洲，原生種超過750種，由於分布範圍廣泛，各種間的原生環境差異頗大，從平地到海拔2500公尺的冷涼高地都可見其分布。文心蘭屬西品系 (*Gower Ramsey*)，是由 *Oncidium Golidana* 及 *Oncidium Guinea Gold* 雜交獲得的切花品種，其主要花色為單一黃色。在台灣文心蘭終年都會開花，尤其以9~11月之間，產量最多但花序品質較差；而冬春兩季產量較少而品質較佳 (許, 1999)。文心蘭為複莖性著生蘭。複莖性蘭的主莖生長一年後，即被新發育的側芽所取代，而且新的主莖可以長得跟原先的莖一樣粗壯，甚至超過之。莖上第零到第一節位膨大形成假球莖，假球莖下為短縮莖，短縮莖由上往下數，有負一節位、負二節位.....等。第零及負一節位上的潛伏芽為花梗芽，其下負二到負四節位的潛伏芽為營養芽。植株上最近長出的假球莖稱為當代假球莖，其餘的稱為非當代假球莖。假球莖上方著生兩片葉片，稱為L1、L2，而假球莖下面最靠近假球莖的兩片葉片，稱為L3、L4，其餘的葉片稱為鞘葉，鞘葉的數目不固定且常會隨著老化而脫落。文心蘭的生活史可分為4個時期：新芽萌發期、新芽發育期、假球莖出鞘期及假球莖成熟期，特徵如下 (Hew and Yong, 1994; 張和李, 1999 及 2000)：新芽萌發期：新營養芽長出。此時假球莖細胞分裂旺盛。

新芽發育期：葉片L1出現。假球莖已有發育，但尚未快速伸長，細胞分裂仍然旺盛；細胞也增大、伸長，細胞中的液胞體積明顯增大，並已分化出儲水的大細胞。基部可見明顯的潛伏芽，第零節位的潛伏芽長約0.8公分時，已分化8片鱗片，但尚未進入花芽分化。

假球莖出鞘期：自外部可見假球莖逐漸伸長肥大，葉片生長速度趨緩，基部之潛伏芽則無明顯改變；殆葉片生長幾近終了時，假球莖也幾近成熟，此時基部之潛伏芽亦分化成幼花序。

假球莖成熟期：假球莖已不易看到具分裂能力的細胞，儲存水分的大細胞及儲存澱粉的小細胞可明顯區分，基本組織幾乎不再具分生能力。隨著花序的發育，假球莖逐漸乾扁；若無花序發育，則基部開始發育新營養芽。

(二)研究目的

(1)台灣的文心蘭切花產業，為我國第二大宗的外銷花卉，更是政府重點培育的精緻農業之一，但面臨兩種問題：(一)量出的產期不符國外需求，雖然產業上花農致力於栽培管理的改進，但仍無法解決。有鑒於我們實驗室所做的研究，發現peroxidase在未開花的假球莖會大量表現，並具有降解IAA的能力。而peroxidase廣泛地存在於真菌、微生物、植物、以及動物中，其中以class III peroxidase (POX) 為植物所特有，並且通常為一巨大基因家族。而POX數種生理功能已被證實，如H₂O₂的移除、有毒化合物的氧化、細胞壁內木質素的合成與降解、生長素的代謝、以及植物受傷及病菌的防禦機制等等。(Veitch等人, 2001)。POX和auxin-binding protein擁有部分相似的結合區也已被報導 (Savitsky et al., 1998, 1999)。Lagrimini等人(1997)將菸草一個轉譯出酸性POX基因的反義股轉殖至本身植物上，結果成功抑制全部POX蛋白質活性達1600倍之多，並造成轉殖株生長快速、開花期提早的現象。但是轉殖此基因的sense股，其轉殖株生長發育情形卻與上述相反。作者推論這酸性POX蛋白質可能會參與IAA的代謝，使植株體內IAA/cytokinin平衡失調，進而造成植株生長發育改變。Yoshida等人(2003)將Horseradish的prxcla基因之sense股轉入白楊與菸草中，結果發現轉殖株生長發育快、開花期提早的現象。所以植物的peroxidase會藉由分解IAA影響植物體內賀爾蒙的平衡，進一步使植物分化與發育。因此，本計畫藉由了解peroxidase的調控機制去改變文心蘭的產期，也許是另一可行方法。

(2)文心蘭屬內種間具有雜交不親合性，選育一個品種需七至十年，相當耗時，使得文心蘭

在傳統育種上要培育出新的花色品種是相當困難。因此，利用基因轉殖技術直接將有用基因導入文心蘭中可能是較為有效的品種改良策略之一。然而每種植物並不可能展現出所有花的顏色，其原因仍受路徑中的各種酵素活性差異表現所致，如玫瑰、菊花因缺乏F3' 5' H 酵素活性，所以無法合成紫色的delphinidin衍生物；而矮牽牛的DFR酵素不足以將dihydrokaempferol轉變成leucopelargonidin，所以無法合成橘色的pelargonidin衍生物(Mol,et al., 1998)。大多數的 Myb屬於 R2R3 基因家族，而玉米的 C1 及p1 基因即是屬於此基因家族，可調控玉米的花青素合成 (Paz-Ares, et al.,1987)，在阿拉伯芥的基因組中估計可能含有超過100 個雙重複MYB區域基因，其中與花青素合成有關聯如：PAP1、PAP2 (Borevitz, et al., 2000)，在矮牽牛花中的Myb 基因有AN1、 AN2 和AN11(Alfenito, et al., 1998)。然而，結構相似的雙重複MYB基因卻可能具備調控類黃酮代謝路徑中不同的結構基因之功能，如玉米的C1 及p1 基因與矮牽牛的AN2 及PhMYB3 基因(Mol,et al.,1996)。許多黃花植物以類胡蘿蔔素結合蛋白 (carotenoid-binding protein)，會將胡蘿蔔素累積在雜色體內，從胡瓜花苞選殖出一種雜色體專一的胡蘿蔔素結合蛋白 (CHRC)，並將CHRC 基因的啟動子接合報導基因，以基因槍轉殖到胡瓜花瓣和其他組織，結果顯示CHRC基因的啟動子只會在胡瓜花瓣專一表達 (Vishnevetsky et al., 1999)。有鑒於我們實驗室所做的研究，以知文心蘭花朵的唇瓣無法累積cyanidin是由於花青素生合成中的CHI、DFR不活化，導致花青素無法累積所至。因此，本計畫將選殖花苞內調控CHI、DFR的轉錄因子Myb及PTD，並選殖類似CHRC花瓣專一啟動子分別驅動Myb或PTD反義股進行基因轉殖，創造紅色或白色新的文心蘭花色品種也是本計劃的重點研究項目之一。

(三)參考文獻

- 許玉妹. 文心蘭栽培管理及採後處理. 國立屏東大學農業推廣委員會編印. 1999.35-38.
- 張允瓊、李咩. 溫度對文心蘭(*Oncidium Gower Ramsey*)假球莖生長及花序發育之影響. 中國園藝.2000.46(2): 221-230.
- Hew CS, Yong JWH** (1994) Growth and photosynthesis of *Oncidium Goldiana*. Journal of Horticultural Science **69**:809-819.
- Tan J., Wang H.L., and Yeh k.w.** (2005). Analysis of organ-specific, expressed genes in *Oncidium* orchid by subtractive expressed sequence tags library. Biotechnology Letters **27**,1517-1528.
- Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y, Matsui H** (2001) A large family of classIII plant peroxidase. Plant Cell. Physiol **42**:462-468.
- Veitch NC, Smith A** (2001) Horseradish peroxidase. Adv. Inorg. Chem **51**:107-162
- Savitsky PA, Gazaryan IG, Tishkov VI, Lagrimini LM, Ruzgas T, Gorton L** (1999) Oxidation of indole-3-acetic acid by dioxygen catalysed by plant peroxidases: specificity for the enzyme structure. Biochem J Jun 15. **340** (Pt 3):579-83.
- Savitsky PA, Rojkova AM, Tishkov VI, Ouporov IV, Rudenskaya GN, Gazaryan IG** (1998) Evidence for indole-3-acetic acid binding site in plant peroxidases. Structural similarity between peroxidases and auxin-binding proteins. Biochemistry (Mosc) Jun. **63**(6):629-33.
- Lagrimini LM, Gingas V, Finger F, Rothstein S, Liu T** (1997) Characterization of Antisense Transformed Plants Deficient in the Tobacco Anionic Peroxidase. Plant Physiol **114**(4):1187-1196.
- Yoshida K, Kaothien P, Matsui T, Kawaoka A, Shinmyo A** (2003) Molecular biology and application of plant peroxidase genes. Appl Microbiol Biotechnol **60**: 665-670
- Elfstrand M, Sitbon F, Lapierre C, Bottin A, von Arnold S** (2002) Altered lignin structure and

- resistance to pathogens in spi 2-expressing tobacco plants. *Planta* **214**: 708-716
- Holton, T. A., Brugliera, F., and Tanaka, Y.** 1993. Cloning and expression of flavonol synthase from *Petunia hybrida*. *Plant J.* 4: 1003-1010.
- Mol, J. N. M., Holton, T. A., and Koe, R. E.** 1995. Floriculture: genetic engineering of commercial traits. *TIB Tech.* 13: 350-355.
- Holton, T. A., and Cornish, E. C.** 1995. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell*, 7:1071-1083.
- Mol, J., Jenkins, G., Schafer, E., and Weiss, D.** 1996. Signal perception, transduction, and gene expression involves in anthocyanin biosynthesis. *Crit. Rev. Plant Sci.* 15: 525-557.
- Dellapenna D, Pogson BJ** (2006) VITAMIN SYNTHESIS IN PLANTS: Tocopherols and Carotenoids. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 711-738
- Hieber AD, Mudalige-Jayawickrama RG, Kuehnle AR** (2006) Color genes in the orchid *Oncidium Gower Ramsey*: identification, expression, and potential genetic instability in an interspecific cross. *Planta* **223**: 521-531
- Vishnevetsky M, Ovadis M, Zuker A, Vainstein A** (1999) Molecular mechanisms underlying carotenogenesis in the chromoplast: multilevel regulation of carotenoid-associated genes. *Plant J* **20**: 423-431
- Martin C, Paz-Ares J.**(1997) MYB transcription factors in plants. *Trends Genet.* 1997 Feb;13(2):67-73.
- Jin, H., and Martin, C.** 1999. MultiFunctionality and diversity within the plant *MYB*-gene family. *Plant Mol. Biol.* 41: 577-585.
- Paz-Ares, J., Ghosal, D., Wienand, U., Peterson, P., and Saedler, H.** 1987. The regulatory *c1* locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to *myb* oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. *EMBO J.* 6: 3533-3558.
- Borevitz, J O., Xia, Y., Blount, J., Dixon, R. A., and Lamb, C.** 2000. Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell*, 12: 2383-2393
- Alfenito MR, Souer E, Goodman CD, Buell R, Mol J, Koes R, Walbot V.** (1998) Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione S-transferases. *Plant Cell.* 1998 Jul;10(7):1135-49.

(四)研究方法

(1)研究方法、進行步驟及執行進度

整個計劃將分A 與B 兩部份同時進行:

A. 選殖出文心蘭過氧化氫酶的啟動子，進一步分析其cis-element，並研究ROS 或環境因子與之關聯，並利用此啟動子轉殖正股POX 及反股POX 至文心蘭中，以期實際應用文心蘭產期的調節。

96 年8 月1 日~97 年7 月31 日

(1)利用genomic walking方式選殖出文心蘭POXs的啟動子。

(a)抽取文心蘭基因體DNA後，利用BD GenomeWalker™ UniversalKit(Cat 5020309)，從POXs基因中設計專一引子，選殖出POXs啟動子。

(2)將POXs 全長啟動子啟動GUS 基因，利用基因槍轉殖法研究其短暫性現的位置及表現強度，進而利用deletion 的方式，轉殖至阿拉伯芥中，找出特殊部位表現之cis-element。

(a)將全長的POXs 啟動子構築於GUS 基因之前，並將構築好的片段建構在pUC19 的載體中，導入大腸桿菌DH5 中，並抽出構築好的質體，進行基因槍轉殖法。

(b)將全長的POXs 啟動子進行deletion，並將deletion 的啟動子片段構築於GUS 基因之前，將構築好的片段建構在pCAMBIA1300 的載體中，並導入農桿菌GV3101

中以進行基因轉殖。

97年8月1日~97年8月31日

(1) 構築特殊片段POXs 啟動子驅動正股及反股POX 基因，並轉殖至文心蘭中。

(a) 將特殊片段POXs 啟動子構築於POX 基因之前，並將構築好的片段建構pCAMBIA1300 的載體中，並導入農桿菌EHA105 中以進行文心蘭PLB 基因轉殖。

(b) 建立文心蘭PLB 轉殖系計

1. 將花軸培養於1/2MS，將一個月後獲的PLB 培養於G10 培養基，並取45 天後再生的 PLB 作為農桿菌轉殖的材料。

2. 將100 μ M 的Acetosyrigone 加入已於28°C 培養兩天的農桿菌，並在黑暗下震盪培養兩小時。

3. 將PLB 浸泡0.5M sucrose 兩小時

4. 將農桿菌與PLB 進行共培養30 分鐘

5. 將培植體於無菌濾紙上晾乾之後，轉移至黑暗下於G10 培養基培養三天。

6. 將PLB 放入含有Cefotaxime 的液體培養基中震盪洗滌，以去除農桿菌。

7. 將PLB 於16 小時光照/8 小時黑暗下培養三個月並利用抗生素進行組織的篩選。

(C) 進行外源基因表現之分析

1. 利用PCR 或Southern blot analysis 確定所得到的文心蘭小苗為轉殖株。

B. 菌西品系文心蘭與花青素和類胡蘿蔔素生合成相關基因、Myb 與專一表現在花瓣的CHRC 啟動子

的選殖及基因調控研究:

96年8月1日~97年7月31日

(1) 建立成熟花苞扣減綠色花苞的EST subtractive library，尋找與花青素及胡蘿蔔素生合成相關的基因，利用RACE PCR 的方式選殖出基因全長。

(a) 粹取成熟花苞及綠色花苞的total RNA，利用BD PCR-Select cDNA Subtraction Kit(K1804-1)獲得有差異性表現基因，進行TA cloning 於pGEM-T easy 的載體中，並導入大腸桿菌DH5 執行定序分析。

(b) 自花芽發育初期假球莖扣減葉子的EST subtractive library 中挑選花青素及胡蘿蔔素生合成相關的基因與相關之目標基因，並設計專一引子。

(c) 粹取成熟花苞的total RNA，利用BD SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit(Cat K1811-1)完成CHS、CHI、DFR、ANS、PTS、PTD、CHRC全長基因的選殖。

(2) 以已發表Myb R2R3 保守區為探針進行Phage cDNA library 之篩選，鈎取其全長及家族基因。

(a) 1. 探針之製備：

a. 收取未成熟文心蘭花苞。

b. 依Myb 基因所具有之序列特性—R2R3 為保守區域，設計引子，並以未成熟文心蘭花苞total RNA 為模板進行tough-down PCR 選殖。

c. 以上述Myb 基因片段作為探針進行Phage cDNA library 之篩選

2. Phage cDNA library 之構築

以未成熟文心蘭花苞total RNA 利用BD SMART™ cDNA Library Construction Kit (Cat No. K1051-1) 構築。

(3) 利用genomic walking 方式選殖出花瓣專一表現CHRC 的啟動子。

(a) 抽取文心蘭基因體DNA後，利用BD GenomeWalker™ Universal Kit(Cat 5020309)，從CHRC基因中設計專一引子，選殖CHRC啟動子。

(4) 利用Northern blot 研究目標基因在不同時間上之差異性表現及特性。

- (a)粹取不同發育時期花苞的total RNA，將花青素與類胡蘿蔔生合成相關基因的3' UTR 區域當作探針，利用Northern blot 的技術來分析這些基因在文心蘭花苞發育時期中的表現模式。
- (b)粹取花瓣及唇瓣的total RNA，將不同類型Myb 基因家族的3' UTR 區域當作探針，利用Northern blot 的技術分析何種類型Myb 調控花青素的生合成基因。

97 年8 月1 日~98 年7 月31 日

(1)將CHRC 全長啟動子啟動GUS 基因，利用基因槍轉殖法研究其短暫性表現的位置及表現強度。

(a)將全長的CHRC 啟動子構築於GUS 基因之前，並將構築好的片段建構在pUC19 的載體中，導入大腸桿菌DH5 中，並抽出構築好的質體，進行基因槍轉殖法。

(2)構築CHRC 啟動子驅動PTD 反譯股及Myb 基因，並轉殖至文心蘭PLB 中。

(a)將全長的CHRC 啟動子構築於反譯的CHS、PTD 和PTS 及Myb 基因之前，並將構築好的片段建構在pCAMBIA1300 的載體中，並導入農桿菌EHA105 中以進行文心蘭基因轉殖。

(b)建立文心蘭PLB 轉殖系計

- 1.將花軸培養於1/2MS，將一個月後獲的PLB 培養於G10 培養基，並取45 天後再生的PLB 作為農桿菌轉殖的材料。
- 2.將100 μ M 的Acetosyrigone 加入已於28°C 培養兩天的農桿菌，並在黑暗下震盪培養兩小時。
- 3.將PLB 浸泡0.5M sucrose 兩小時
- 4.將農桿菌與PLB 進行共培養30 分鐘
- 5.將培植體於無菌濾紙上晾乾之後，轉移至黑暗下於G10 培養基培養三天。
- 6.將PLB 放入含有Cefotaxime 的液體培養基中震盪洗滌，以去除農桿菌。
- 7.將PLB 於16 小時光照/8 小時黑暗下培養三個月並利用抗生素進行組織的篩選。

(C) 進行外源基因表現之分析

1.利用PCR 或Southern blot analysis 確定所得到的文心蘭小苗為轉殖株。

整個研究工作分成A、B 兩部份敘述：

A. Peroxidase 基因在花序發育過程假球莖中的功能型研究

一、建構文心蘭未開花假球莖 λ cDNA library及POX cDNA

的鈎取與基因特性分析

利用EST library中註釋為peroxidase的clone為探針，從未開花假球莖 λ cDNA library中選殖peroxidase基因，經由比對結果共獲得9個全長POX cDNA基因全長：分別命名為POX4、POX13、POX18、POX20、POX22、POX3-3、POX3-9、POX3-19、POX3-22。Savitsky等人(1995)曾將辣根的過氧化氫酶(Horseradish peroxidase)與auxin binding protein及不同物種peroxidase進行胺基酸比對，結果發現有五個domain與auxin binding有關(圖1a)，以POX22為例進行胺基酸序列分析比對，發現其Helix B domain與helix D and D' domain間的Loop之胺基酸序列，有極度之保守性(圖1b)。Duroux等人(2003)，根據ORF將阿拉伯芥73條POXs分類成A-S14個亞群(圖2a)，圖中除POX18外，其他S亞類AtP1子類基因均來自雙子葉，它們之間的氨基酸相同率都在80%以上，它們與AtP2子類(如AtP2和OsaXP_)的相同率在50%以上，但與其他大類(非S亞類)，如A亞類的AtP16，X亞類的OsaAAG_，C亞類的AofBAA等的相同率只有30%左右。單子葉中與文心蘭親緣關係最近的蘆筍(*Asparagus officinalis*)現有的POX基因(見三個Aof*基因)與POX18也不屬於同一亞類(圖2b)。由此可知文心蘭的POX基因與目前已知的單子葉植物迥異，卻與雙子葉植物有較近親緣性，並且可能具有降解IAA的能力。

二、以北方墨漬法分析POX基因表現及假球莖內H₂O₂的含量

在9個全長POX cDNA基因中挑選七個POX基因做成探針，分別偵測它們在三種不同生長階段之假球莖的表現情形，發現這些POX會在未開花假球莖中大量表現，於假球莖具有3公分花芽時表現量又下降，隨著花軸發育其表現又增加(圖3a)。在三種不同生長階段假球莖中利用DAB在過氧化氫的存在下將會產生聚合作用，使組織切片變成棕褐色，來辨識過氧化氫的存在及萃取假球莖內的H₂O₂，發現在未開花假球莖中H₂O₂含量最多，於假球莖具有3公分花芽時含量最少，隨著花軸發育其含量又增加。(圖3b, c)；H₂O₂在假球莖組織中的含量變化似乎與POX基因表現模式相當一致，就是當H₂O₂含量高時，POX基因表現很強，反之亦然。

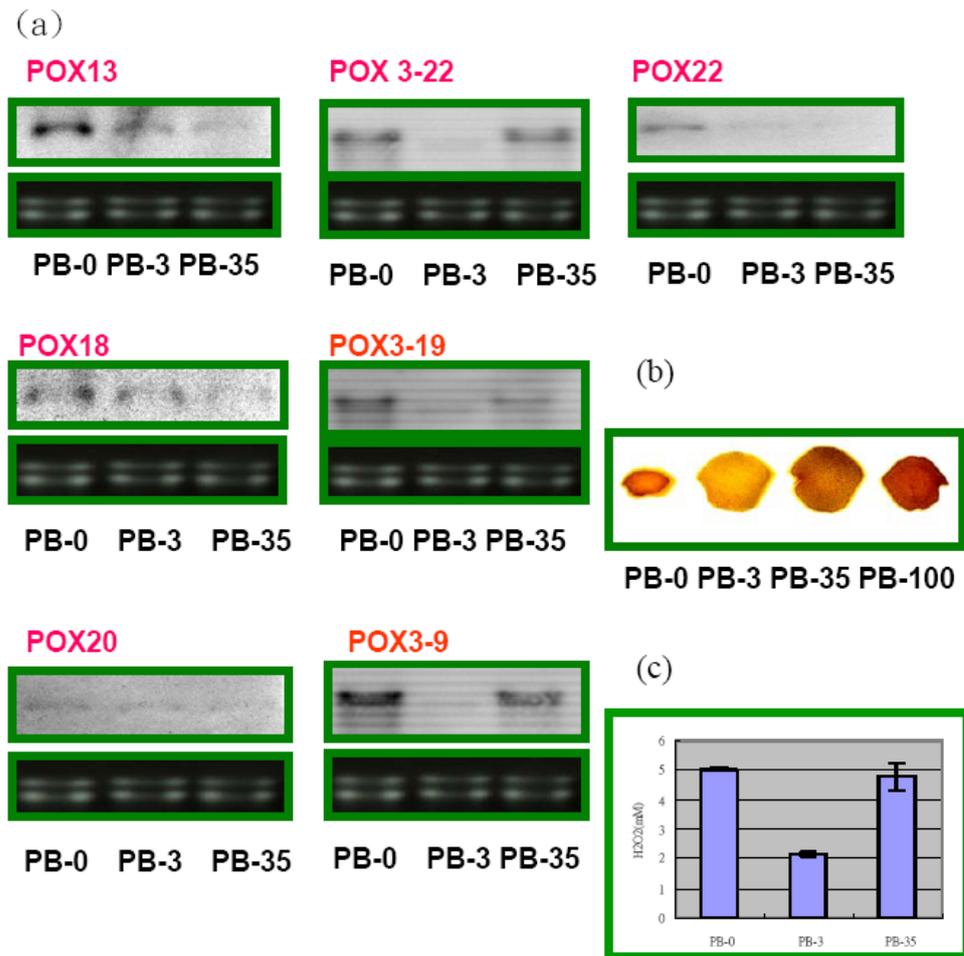


圖 3、(a)以北方墨漬法觀察不同 POX 基因在不同時期假球莖的表現模式

(b)不同時期假球莖組織H₂O₂含量之染色觀察

(c)不同時期假球莖組織內H₂O₂含量檢測

PB-0:未開花前假球莖

PB-3:含 3cm 花芽之假球莖

PB-35:含 35cm 花芽之假球莖

PB-100:含 100cm 花芽之假球莖

POX:表示文心蘭假球莖中的過氧化氫酶基因

三、以RT-PCR分析不同POX基因在不同組織與逆境中的表現情形及逆境處理後假球莖內H₂O₂ 的含量

從11 個POX cDNA基因中的3' UTR及5' UTR設計專一的引子，利用RT-PCR分析POX1、POX4、POX3-9、POX13 在不同組織表現情形，發現POX1 及POX3-9 在文心蘭的根、葉、及不同階段假球莖皆會表現，但在假球莖具有3 公分花芽時表現量最少。而POX4 則會持續在不同組織表現；反之POX13會專一表現在假球莖中(圖4)。以H₂O₂(100mM) and ABA(100uM) or chilling at 40C處理文心蘭12 小時，來分析POX13在不同組織表現情形，結果發現在經過這些逆境處理後，POX13 基因表現量都會比未處理的假球莖還要高(圖十)。而經過這些逆境處理的文心蘭假球莖內H₂O₂含量也因POX表現量增加而減少(圖5)。

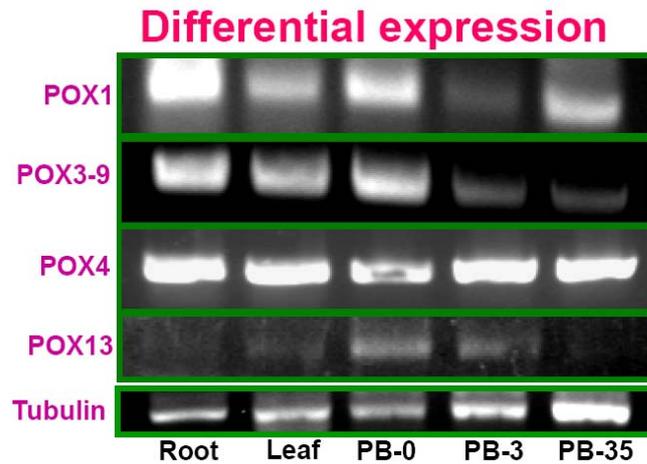


圖 4、利用 RT-PCR 來偵測 POX1、POX4、POX3-9 及 POX13 在文心蘭不同組織的表現情形。PB-0: 未開花前假球莖，PB-3: 含 3cm 花芽之假球莖，PB-35: 含 35cm 花芽之假球莖。Tubulin 基因作為對照

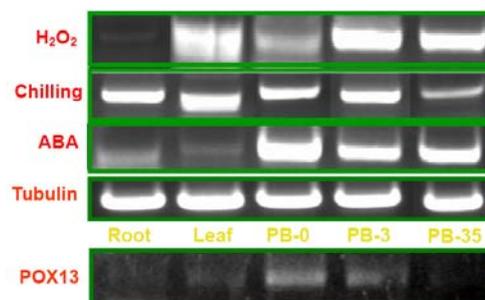


圖 4、不同逆境因子，如H₂O₂(100mM)，ABA(100uM)及 4°C 低溫處理文心蘭 12 小時，再利用 RT-PCR 來偵測 POX13 在文心蘭不同組織的基因表現情形。PB-0: 未開花前假球莖，PB-3: 含 3cm 花芽之假球莖，PB-35: 含 35cm 花芽之假球莖。

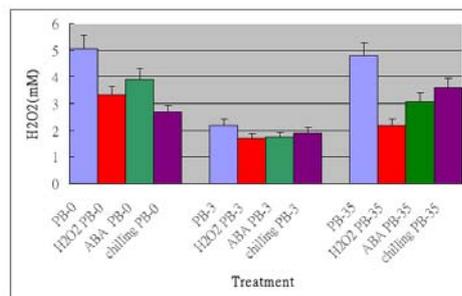


圖 5、不同逆境因子，如H₂O₂(100mM)，ABA(100uM)及 4°C 低溫處理文心蘭 12 小時，並檢測不同時期假球莖組織內的H₂O₂含量PB-0: 未開花前假球莖，PB-3: 含 3cm 花芽之假球莖，PB-35: 含 35cm 花芽之假球莖。

四、構築POX22 coding region與Green Fluorescent Protein(GFP)融合的載體及其 localization分析利用基因槍將構築好的POX22 cDNA::GFP(GFP 蛋白質接在POX22 的C 端處)載體及只有GFP載體打入洋蔥表皮，並以螢光顯微鏡觀察。結果發現GFP 載體單獨打入洋蔥表皮時，其表現均勻分佈在細胞質與細胞核中，而以POX22::GFP 載體打入洋蔥表皮時，其表現只分布在細胞間隙中，此原因應是POX22 蛋白質N 端具有分泌到胞外的signal peptide(圖6)，故其蛋白質可被輸送至細胞間隙中。

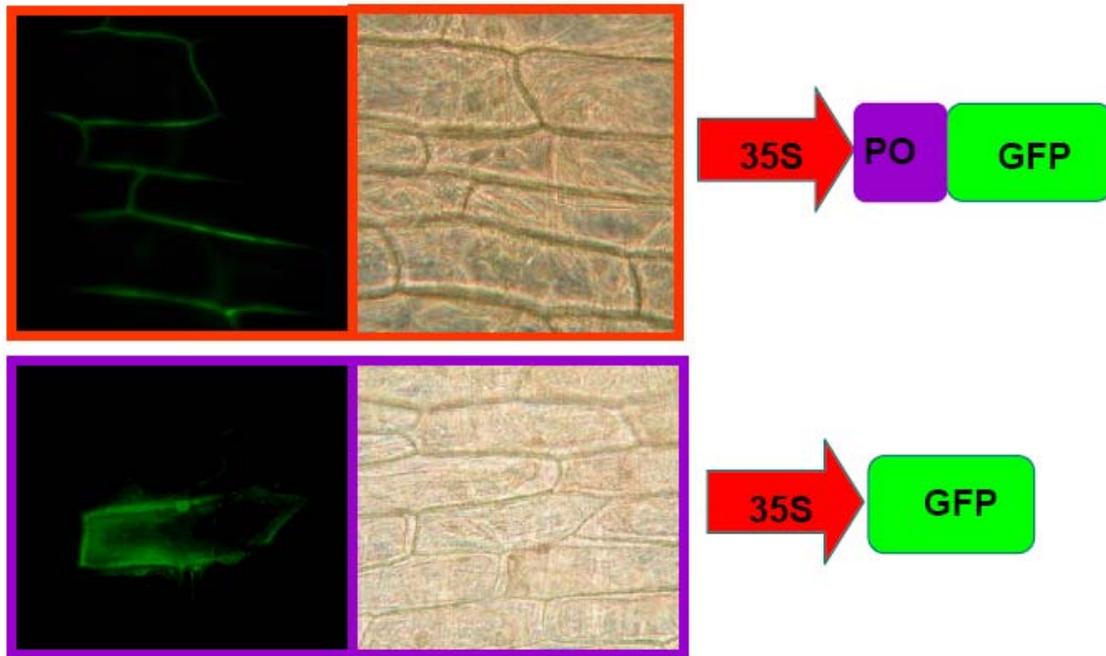


圖 6、分析 POX22 蛋白質在細胞中的座落位置。

將 POX22 基因結合 GFP 報告基因，再利用基因槍打入洋蔥皮細胞，以分析 POX22 蛋白質之座落位置。

伍、構築POX22、POX20 coding region 與GST 融合的載體及其融合蛋白與IAA 進行in vitro 反應分析將POX22 及POX20 之coding region 構築於pGEX-6P-1 之表現載體中，利用大腸桿菌經IPTG 誘導產生大量的GST-POX22 及GST-POX20 融合蛋白表現，並通過Glutathione Sepharose 4B管柱把融合蛋白純化出來。由蛋白質電泳中發現到兩條明顯的條帶，一為GST 蛋白質，分子量為26KD、另一為POX22 融合蛋白，分子量為65KD(圖7a)。隨後將純化出來的融合蛋白與IAA 加在一起隔夜反應，經TLC 分析 IAA 成分之變化。再經由Van Urk Salkowski 試劑染色，使TLC 上的IAA呈現褐色。結果發現反應液只加IAA 隔夜反應時也會造成IAA 被降解，但是加入融合蛋白於反應液時IAA 被降解的量更多(圖7b)，由此可以得知POX22、POX20 在 in vitro 的反應中也會造成IAA降解。

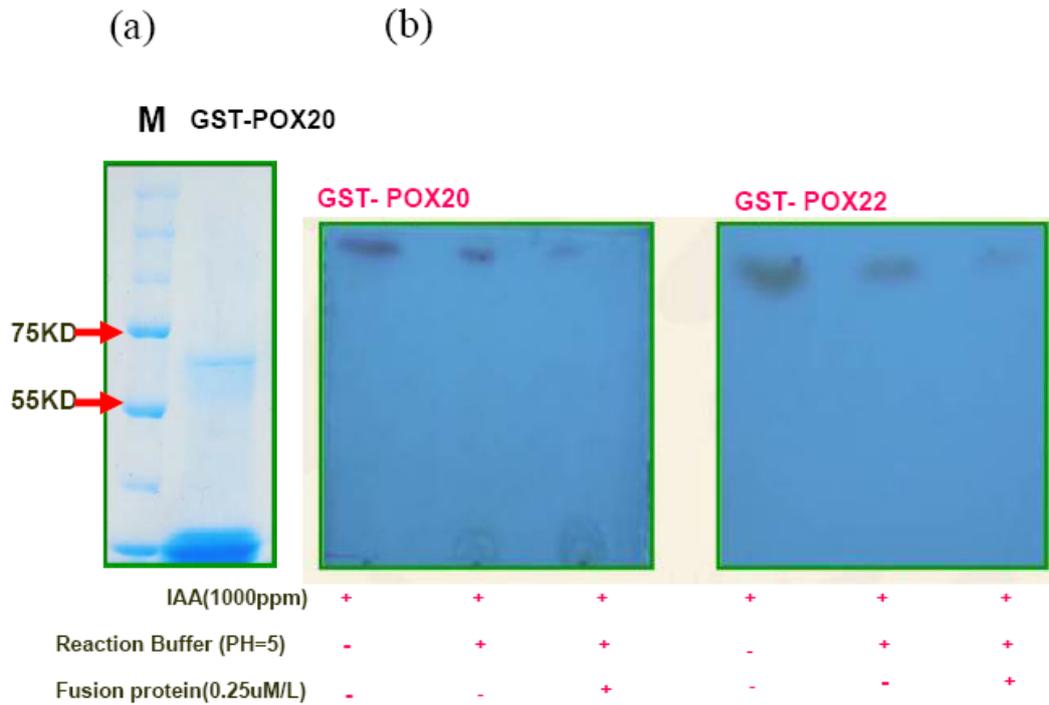


圖 7、POX20 及 POX22 GST 融合蛋白與 IAA 進行 in vitro assay。

將 POX 組合蛋白質與 IAA 反應，然後經由薄膜色層分析法，
分析 IAA 的含量。

六、阿拉伯芥轉殖POX 基因及其表現分析

構建七個POX4、POX13、POX18、POX20、POX22、POX3-9、POX3-19 於PBI121 轉殖載體中，透過農桿菌攜帶並經由花序浸染(floral dipping)而轉殖到野生型阿拉伯芥，並利用抗生素篩選T1 及T2 轉殖株。結果發現播種後14 天的T2 轉殖株中，表現POX13、POX20、POX22 及POX3-9 基因的轉殖株在培養皿裡會有提早開花的現象，利用RT-PCR 分析這些POX 表現的量也比WT 多(圖8)。而播種後20 天的POX 轉殖株根系也比WT 來的短且分支少(圖9)。

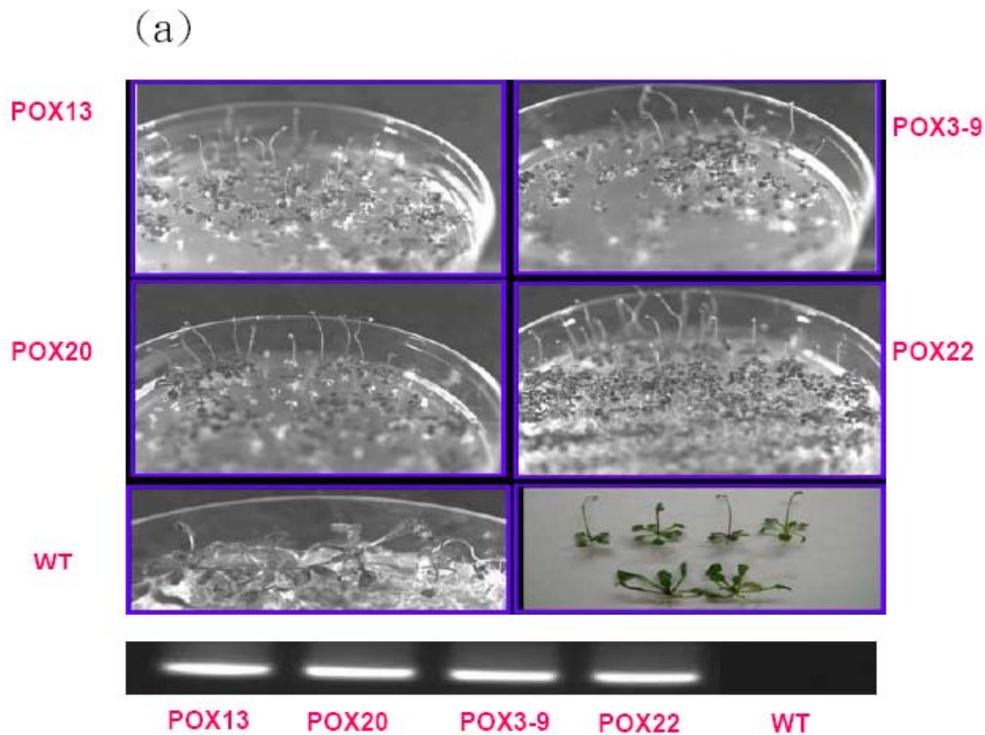


圖 8、(a)POX13、POX20、POX22 及 POX3-9 之阿拉伯芥 T2 轉殖株外表型及轉殖基因表現情形

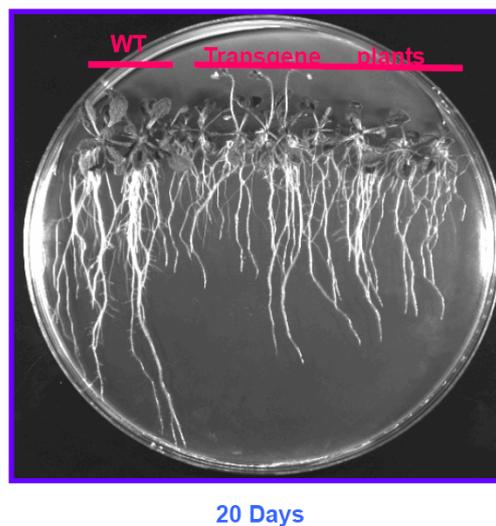


圖 9、阿拉伯芥野生型與 POX 轉殖株根系之外表型之比較。
植株為發芽後 20 天之生長情形。

七、阿拉伯芥轉植株及PB-0、PB-3、PB-35 三階段假球莖IAA 的分析

將播種後30 天的T2 POX 轉植株，利用GC-MS 去分析轉植株體內IAA 的含量，結果發現WT 的IAA 的含量為830.9 ng/g DW，POX20 轉植株IAA 含量為381 ng/g DW、POX18 轉植株IAA 含量為99.8 ng/g DW、POX3-9 轉植株IAA 含量為198.5 ng/g DW、POX3-19 轉植株IAA 含量為132.5 ng/gDW，然而POX13 與POX22 轉植株IAA 含量無法測得(圖10b)。檢測三種不同發育時期假球莖內的IAA，發現在peroxidase 表現量大的PB-0 階段，其IAA 含量最低(圖11)。由上述結果得知，阿拉伯芥轉植株中的IAA 含量與POX 基因的大量表現呈現負相關，此亦顯示POX 可能具有分解IAA 的功能，故導致轉植株中IAA 濃度的明顯下降。

(b)

轉植株	IAA 的含量
WT	830.9 ng/g DW
POX13	nt ng/g DW
POX18	99.8 ng/g DW
POX20	381 ng/g DW
POX22	nt ng/g DW
POX3-9	198.5 ng/g DW
POX3-19	132.5 ng/g DW

圖 10、(b)阿拉伯芥野生型與 POX 轉植株內 IAA 含量的檢測

In three developmental stages of <i>Oncidium</i> pseudobulb	IAA 的含量
PB-0	49.57 ng/g DW
PB-3	89.76 ng/g DW
PB-35	612.67 ng/g DW

圖 11、三種不同發育時期假球莖內 IAA 的檢測

基於上述研究，我們發現Peroxidase 具有降解IAA 的能力，進而影響假球莖內 IAA/cytokinin 比例，進一步調控文心蘭花芽的形成。而這方面的資料正submit to Plant Physiology。目前我們正著手選殖出peroxidase 的啟動子，因此，未來的工作會著重於探討何種環境因子或ROS 可以調控peroxidase 啟動子的作用機制。

B. 花苞發育過程中花青素及類胡蘿蔔生合成相關基因的表現研究

一. 製備文心蘭花苞扣減式基因庫（成熟花苞扣未成熟花苞）

在成熟花苞扣減未成熟花苞的EST 基因庫中，發現到數種與花青素及類胡蘿蔔生合成相關基因，如：chalcone synthase (CHS)、chalcone isomerase (CHI)、dihydroflavonol 4-reductase (DFR)、anthocyanidine synthase (ANS)、Phytoene synthase (PTS)、Phytoene desaturase (PTD)。我們利用北方轉漬法分析花青素生合成相關基因在花苞發育時期的表現，發現這些基因會隨著花苞成熟有加強表現的現象，而唇瓣呈現黃色是因為CHI、DFR 不活化，導致花青素無法累積所至(圖1)。

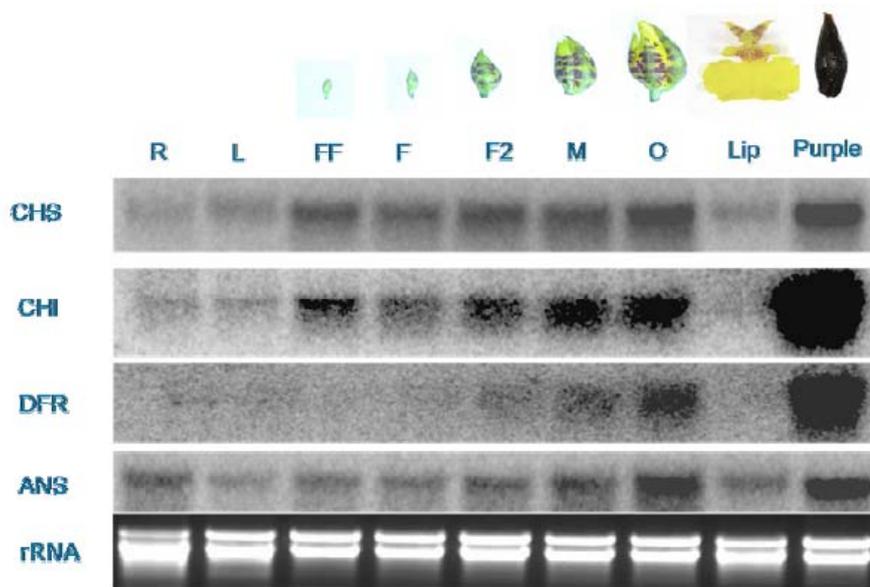


圖 1. 花青素生合成相關基因在花苞發育時期的表現
purple: 為香水文心蘭的花苞

未來我們將進一步利用RACE PCR 選殖出這些基因全長，完成其功能性分析，並選殖出Myb 及花瓣專一啟動子，藉由轉殖來改變文心蘭花色。

大陸杭州地區花卉產業現況之考察

葉開溫 台大植物科學所

大陸地區的花卉產業隨著當地經濟起飛而快速地發展起來，大體來說，消費額最大宗的地區還是集中在東南海岸地區，如北京、上海、杭州一直到廣州地區，其中，上海及杭州一帶最值得關注，因為此地區的經濟繁榮快速，人民的生活水準相當高，又加以當地的氣候環境，除了適宜商業發展之外，又適於農業生產，以浙江及江蘇為例，一向是魚米之鄉，氣候溫和，土壤肥沃，民性勤快，又加上生活富裕，所以對於花卉產業之發展，不但「適合生產」，又有「消費能力」，此地相對於雲南地區，雖然適於花卉栽培生產，但因居民生活水準不高，只能依賴外銷供應至大陸其他地區。

今年因為執行國家型農業生物技術計畫項下的「文心蘭開花生理生化之分子生物學研究」之故，一向對於大陸地區的文心蘭產業特別關注，由於文心蘭已經在短短這幾年躍居台灣外銷切花的第二大宗（去年已達一千八百萬株），在台灣已成重要的經濟作物，但不可諱言，政府及民間一直擔心文心蘭可能步蝴蝶蘭之後塵，將種原、種苗及栽培技術外流至大陸，最後導致大陸企業後來居上，影響到台灣文心蘭的發展。杭州地區的花卉產業大致分佈於四個區域，一個是蕭山地區（當地有一個林木批發市場），一個是舟山群島地區，一個是余杭海寧地區及蘭溪義烏附近。此次參觀特別針對於余杭海寧地區，參觀了許多花卉公司，許多公司都擁有精密溫控的栽培溫室，在培植蝴蝶蘭方面，栽培技術都不輸於台灣業者，其溫室設備亦極精良，所生產的蝴蝶蘭品質亦不差，另外，他們對於組培的繁殖技術亦學習地相當快速，所以從這些觀點來看，蝴蝶蘭產業對兩岸來說，我們的優勢大概只剩下「種原」這一環節可掌握優勢，大陸業者目前對於育種技術仍未臻純熟，而台灣業者則有許多育種家，我們今後只能依賴持續的培育新品種，引導市場趨勢，故政府與民間應多注意此點。

至於文心蘭的栽培，已經見到有零星的試驗生產，據當地業者提供資料，舟山群島地區已有台灣業者引進試種，我在余杭海寧地區僅看到兩家業者僅栽培各約一至二萬盆左右，其所生產的花卉成品皆為盆花而非切花，且盆花之品質大多屬於C級品，這個差異，不知是因為其栽培技術尚未成熟，抑或當地環境不適宜栽培所致，仍然值得我們觀察，但與當地業者討論有關文心蘭產業時，對方皆對此花卉表達相當高的興趣，唯一的抱怨是消費者仍未對此花卉施以關注，以致於銷售上仍存在困難。

走訪杭州及上海市的鮮花店時，主要的切花種類為百合、玫瑰、洋桔梗及菊花四項，其中，前三項主要是年輕人購買，菊花則大多用於祭祀之用，與浙大園藝系夏宜平教授訪談得知，他個人認為杭州的花市成長甚快，他個人非常看好這市場。在此次參訪行程中，印象最深的兩家企業，一是森禾種業公司，此家公司

共有五個栽培場，每場佔地都在二至五甲之間，公司主要生產為草花，如鳳仙、仙客來、秋海棠及春石斛等，其中春石斛是主力，此家經營者為大陸當地人；另一家則是位於海寧市長安鎮的國美園藝公司，業者是台灣人，主要經營項目為庭園林木，其中紅葉石楠木為此公司主力產品，該公司成立至今第三年，去年營業額八千萬人民幣，前年為五千萬人民幣，員工共計只有十五人，獲利豐厚。

總結而言，大陸的園藝產業這數年來之發展非常快速，尤其是蝴蝶蘭產業除了在育種不如台灣外，栽培與管理已與台灣並駕齊驅；由於其市場胃納量相當龐大，故業者投入相當積極，沒有關鍵性技術的花卉似乎在日後無法與大陸競爭；文心蘭產業若要在台灣獨樹一幟，似乎應發展種原保護與栽培的關鍵技術，同時，應不斷注意其發展狀況，以擬定我們的因應對策。



(圖一)



(圖二)



(圖三)



(圖四)



(圖五)