

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

非光合作用被子植物質體基因研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2311-B-002-026-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：國立臺灣大學生態學與演化生物學研究所

計畫主持人：胡哲明

計畫參與人員：徐馨怡，呂佳穎

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 11 月 3 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

非光合作用被子植物質體基因研究

Studies of plastid genes in non-photosynthetic plants

計畫編號：NSC 92-2311-B-002-026

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

計畫主持人：胡哲明 國立台灣大學生態學與演化生物學研究所

計畫參與人員：徐馨怡，呂佳穎 國立台灣大學生態學與演化生物學研究所

一、中文摘要

葉綠體存在於所有綠色植物體內，為進行光合作用的場所。然而有些被子植物喪失光合作用的能力，成為全寄生或腐生的植物。這些非光合作用植物卻仍然保有一個縮減的質體基因組，其中大部分與光合作用相關的基因，如*rbcL*等，都已丟失或成為偽基因(pseudogene)。本計畫即以九種台灣的非綠色被子植物為材料，進行其質體基因的分析，探討質體基因的演化。結果共獲得九條18S rDNA、七條16S rDNA序列，並依據其序列進行譜系分析。另外穗花蛇菰、無根藤和列當均利用PCR得到接近全長的*rbcL*與*matK*序列。但是在菟絲子中只得到*rbcL*，而野菰只能得到*matK*的序列。而RT-PCR的結果顯示菟絲子的*rbcL*有微量表現，應具有些微光合作用能力。

關鍵詞：非光合作用植物，質體基因組，18S rDNA，16S rDNA，*rbcL*，*matK*

Abstract

Chloroplasts are the eukaryotic organelles mainly responsible for photosynthesis. There are some flowering plants, however, lost the photosynthetic

ability and became holoparasitic or saprophytic plants. The non-photosynthetic plants usually retain a reduced plastid genome, although many of plastid genes are lost or become pseudogenes, especially the photosynthesis-related genes such as *rbcL*. In order to elucidate the plastid genome evolution in non-photosynthetic plants, we examined nine non-photosynthetic plants native to Taiwan. We obtained all 18S rDNA sequences and seven 16S rDNA sequences of the examined taxa, and further using the sequences to perform phylogenetic analyses. In *Balanophora*, *Cassytha* and *Orobanch*e, we obtained almost full length *rbcL* and *matK* sequences. However, we only obtained *rbcL* from *Cuscuta* and *matK* sequence from *Aeginetia*. The RT-PCR result shows that the *rbcL* transcripts were detected in *Cuscuta*, and suggests *Cuscuta* may have retain photosynthetic ability.

Keywords: non-photosynthetic plants, plastid genome, 18S rDNA, 16S rDNA, *rbcL*, *matK*

二、緣由與目的

葉綠體為植物體內負責行光合作用的胞器，衍生自藍綠菌的內共生。不過演化至今，葉綠體的基因組大小只剩藍綠菌的5~10%，約為150~200kb，縮減了20~30倍之多(Martin *et al.* 2002)。葉綠體基因組成環狀構造，主要可分為三類：(1)與轉錄、轉譯有關的基因，(2)與光合作用有關的基因，以及(3)其他一些與脂肪酸、色素等生合成相關的基因(Lohan *et al.* 1998)。

然而在全寄生或腐生植物，這些喪失光合作用能力的被子植物中，只存在退化的葉綠體(dePamphilis *et al.* 1990, Nickrent *et al.* 1997)，也保有一個更為縮減的質體基因組(20~88kb)。這些非光合作用植物質體中與光合作用相關的基因，大部分已丟失或成為偽基因(pseudogene)，如*rbcL*等(Wolfe *et al.* 1992)。因此非光合作用植物實為研究質體演化的最佳天然材料，透過研究其質體，可進一步了解質體在植物細胞中所扮演的角色，以及基因在無演化選汰壓力下的行為。

目前已有一些相關研究針對非光合作用植物的*rbcL*進行分析(van der Kooij *et al.* 2000)，本計畫即以九種台灣的非綠色被子植物為材料：*Mitrastemon kanehirai* (菱形奴草，大花草科)，*Balanophora laxiflora* (穗花蛇菖，蛇菖科)，*Cuscuta australes* (菟絲子，旋花科)，*Aeginetia indica* (野菖，列當科)，*Orobanchae coerulea* (列當，列當科)，*Cassytha filiformis* (無根藤，樟科)，*Cheilotheca humilis* (水晶蘭，鹿蹄草科)，*Cheilotheca macrocarpa* (阿里山水晶蘭，鹿蹄草科)以及*Galeola lindleyana* (山珊瑚，蘭科)。利用PCR及點狀雜合法來分析這些非光合作用植物的細胞核基因18S rDNA以及質體基因16S DNA、*rbcL*和*matK*，也進一步

將序列進行譜系分析以及藉由RT-PCR檢測三種非光合作用植物*rbcL*基因的表現。進而探討光合作用基因在非光合作用植物中的演化。

三、結果與討論

細胞核基因 18S rDNA

所有選取的非光合作用植物皆能利用通用的引子增幅其18S rDNA片段，經過定序後，其序列加上其他由GenBank下載的被子植物18S rDNA序列以ClustalX進行排序分析，再利用PAUP*4.0進行譜系分析，得到譜系樹如Fig. 1。除菱形奴草、穗花蛇菖外，其餘七種植物皆與相近物種聚集在一起；而整個18S rDNA譜系樹中的親緣關係也大致與其他研究符合(Nickrent *et al.* 2000)。不過譜系樹的bootstrap值不高，而菱形奴草及穗花蛇菖未與相近物種群聚一起，這些則尚待進一步的譜系分析來加以釐清。

質體基因

16S rDNA

九種植物中，菱形奴草及穗花蛇菖無法利用通用的引子獲得16S rDNA片段，顯示其16S rDNA具有較大的變異。其他七種非光合作用植物以及由GenBank下載的被子植物16S rDNA序列經過譜系分析後，所得譜系樹如Fig. 2。所有非光合作用被子植物在譜系樹中的位置皆靠近其親緣關係相近物種，而16S rDNA譜系樹也與Nickrent所建構的相仿(Nickrent *et al.* 2000)。

*rbcL*與*matK*

在選取的植物中，穗花蛇菖、無根藤及列當均能用通用引子獲得接近全長的*rbcL*與*matK*序列。菟絲子和野菖則分別

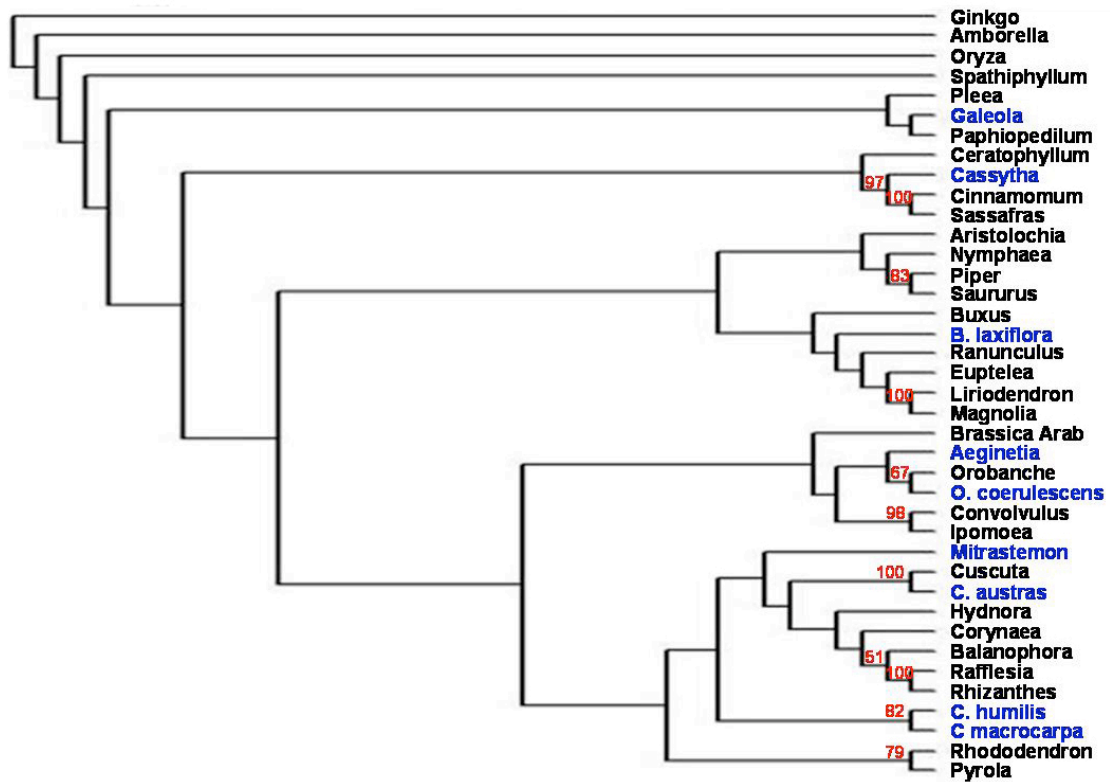


Fig. 1 利用Neighbor-joining分析方法所建構的18S rDNA譜系樹。藍色字體為本研究所選取的九種非光合作用被子植物，紅色數字則為bootstrap值。

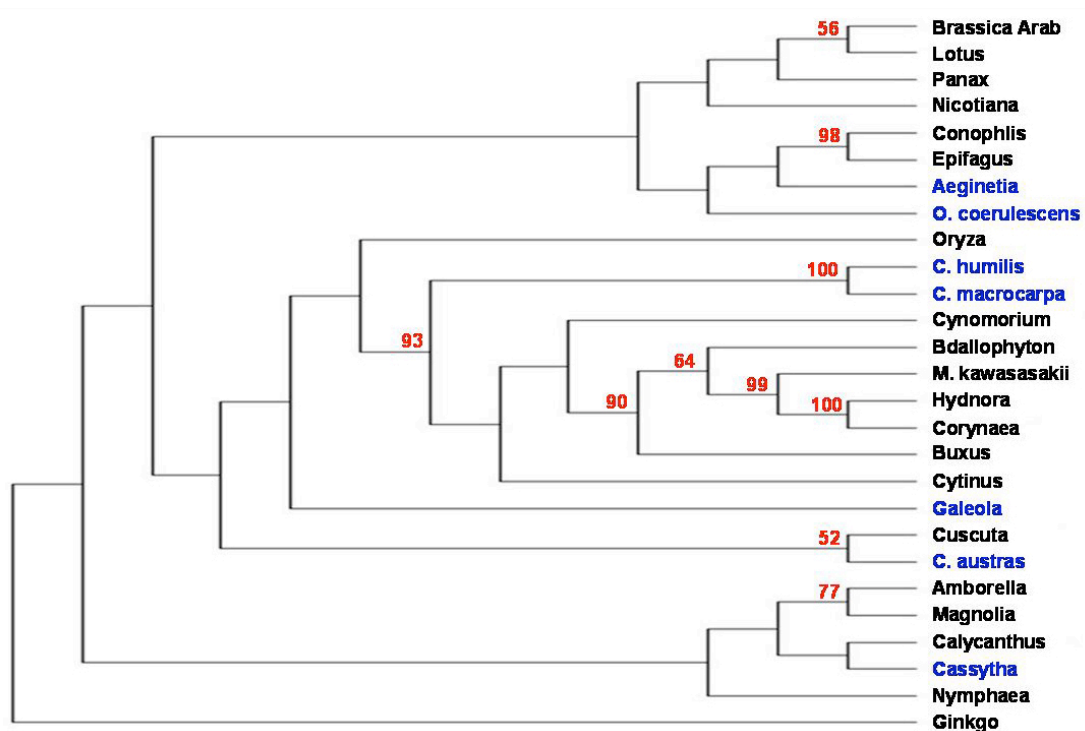


Fig. 2 利用Neighbor-joining分析方法所建構的16S rDNA譜系樹。藍色字體為本研究所選取的非光合作用被子植物，紅色數字則為bootstrap值。

只能得到*rbcL*及*matK*序列；而菱形奴草、兩種水晶蘭以及山珊瑚皆無法成功的增幅*rbcL*與*matK*序列。進一步利用點狀雜合法分析(Fig. 3)，結果顯示所有的非光合作用植物均具有*rbcL*與*matK*，表示這九種植物皆存有質體基因組，而無法利用PCR增幅者，其基因可能已產生相當的變異，但尚未丟失。

*rbcL*基因的表現

為了進一步了解光合作用相關基因的表現，我們選取了菱形奴草、穗花蛇菰和菟絲子，利用RT-PCR檢測其*rbcL*的表現(Fig. 4)。雖然經由PCR以及點狀雜合分析結果得知菱形奴草與穗花蛇菰皆具有*rbcL*基因，但由RT-PCR結果可看出，兩者的RT-PCR產物均小於正常大小，其基因序列應已經產生相當的變異。因此菱形奴草及穗花蛇菰的*rbcL*雖可轉錄成mRNA，但是否真正具有功能，仍需進一步的實驗來加以確定。反之，菟絲子

RT-PCR的結果看出具有正常大小的產物，顯示其*rbcL*基因有微量的表現；加上菟絲子的植物體為黃綠色，由此推測菟絲子可能具有些微光合作用能力，此結果與van der Kooij等人的研究相符(van der Kooij *et al.* 2000)。

18S與16S rDNA建構出的譜系樹兩者間並無太大的衝突之處，也與其他研究相吻合；不過也未能釐清分類地位尚不清楚的非光合作用植物物種，有待更進一步的譜系分析。本研究結果大致上可對應到植物體的形態，如四個基因均能增幅的無根藤其幼株為明顯的綠色，列當植株則為褐色。只有三個基因能增幅的菟絲子為黃綠色，而穗花蛇菰與野菰植物體也具有明顯的顏色。其餘菱形奴草，兩種水晶蘭以及山珊瑚的植物體顏色由白至淡黃，均不顯著；其質體基因的增幅結果也不甚理想。其中，菱形奴草只成功增幅18S rDNA，推測其質體基因組很可能有極端

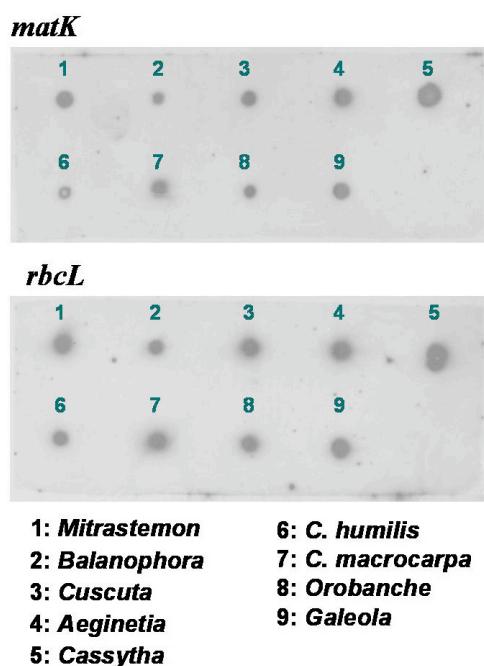


Fig. 3 九種非光合作用植物之*matK*與*rbcL*基因點狀雜合分析結果。

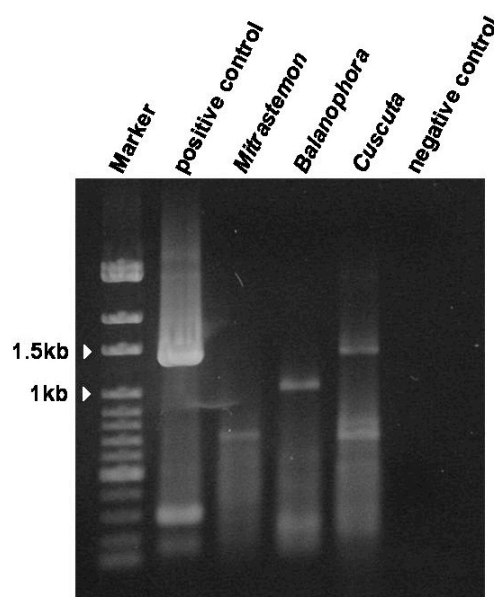


Fig. 4 利用RT-PCR進行菱形奴草、穗花蛇菰及菟絲子*rbcL*基因之表現結果。

變異的質體基因組。不過上述推論，仍需進一步進行其他質體基因的分析，以及檢測光合作用相關基因的表現來加以證實。

四、計畫成果自評

透過本研究計畫的結果，我們能夠進一步的了解質體基因組的演化，進而探討質體在植物細胞中的角色，以及光合作用相關基因在無選汰壓力下的演化行為；而相關的譜系分析也有助於釐清這些非光合作用植物的分類地位。除此之外，這些全寄生或腐生被子植物的光合作用相關基因從具有些微功能到已產生相當的變異，可看出這些植物雖為全寄生或腐生，但其質體具高度的變異，顯示這些植物的多樣性。期能藉由更進一步的研究，讓我們對非光合作用植物以及質體的演化有更深入的了解。

五、參考文獻

- dePamphilis, C. W., and J. D. Palmer (1990) Loss of photosynthetic and chlororespiratory genes from the plastid genomes of a parasitic flowering plant. *Nature* 348: 337-339.
- Lohan, A. J., and K. H. Wolfe (1998) A subset of conserved tRNA genes in plastid DNA of nongreen plants. *Genetics* 150: 425-433.
- Martin, W., T. Rujan, E. Richly, A. Hansen, S. Cornelsen, T. Lins, D. Leister, B. Stoebe, M. Hasegawa, and D. Penny (2002) Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 12246-12251.
- Nickrent, D. L., O. Y. Yan, R. J. Duff, and C. W. dePamphilis (1998) Do nonasterid holoparasitic flowering plants have plastid genomes? *Plant Mol Biol* 34: 717-729.
- Nickrent, D. L., R. O. Duff, A. E. Colwell, A. D. Wolfe, N. D. Young, K. E. Steiner, and C. W. dePamphilis (2000) Molecular phylogenetic and evolutionary studies of parasitic plants. In *Molecular systematics of plants II: DNA sequencing*, eds. D. E. Soltis, P. S. Soltis, and J. J. Doyle, pp. 211-241. Kluwer Academic Publishers, Norwell.
- van der Kooij, T. A. W., K. Krause, I. Dorr, and K. Krupinska (2000) Molecular, functional and ultrastructural characterisation of plastids from six species of the parasitic flowering plant genus *Cuscuta*. *Planta* 210: 701-707.
- Wolfe, K. H., C. W. Morden, and J. D. Palmer (1992) Function and evolution of a minimal plastid genome from a nonphotosynthetic parasitic plant. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10648-10652.