

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

研發文心蘭功能性基因體以提昇其花卉品質及產量--文心 蘭切花老化相關基因的分離和功能性研究 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：整合型
計畫編號：NSC 96-2317-B-002-019-
執行期間：96年08月01日至97年12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：鄭石通

計畫參與人員：教授-主持人(含共同主持人)：鄭石通
碩士-專任助理人員：陳攻孝
碩士-兼任助理人員：劉朴桓
碩士-兼任助理人員：梁詩婕

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 97 年 05 月 31 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

研發文心蘭功能性基因體以提昇其花卉品質及產量-文心蘭切花老化相關基因的分離和功能性研究

計畫類別：☐ 個別型計畫 ☒ 整合型計畫

計畫編號：NSC 96-2317-B-002-019

執行期間： 96 年 8 月 1 日至 97 年 7 月 31 日

計畫主持人：鄭石通

共同主持人：

計畫參與人員：劉朴桓、梁詩婕、陳玫孝

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：台灣大學植物科學所

中 華 民 國 97 年 5 月 30 日

一、中英文摘要：

文心蘭切花廣受消費者歡迎，是臺灣外銷第二大切花。文心蘭採花後因分級和裝箱處理，因花枝糾纏，使得花藥脫落，小花會提早老化。在夏秋盛產期，文心蘭較快老化，即使經過繁複的保鮮劑處理，瓶插壽命只能多 3-4 日。因此如何能有效並且安全地延緩文心蘭老化，降低文心蘭小花捲曲掉落，是提高文心蘭品質的重要課題。本計畫以 Gower Ramsey 為材料，分別在花辦全開時和花開始凋萎時(花唇瓣脈紋出現且脈紋之間呈現透明)，(1) 抽取 RNA，以 differential display 方式和 subtraction library 建立的兩種方式，分離啟始文心蘭老化相關的 cDNA 片段。(2) 分離蛋白質，以蛋白質二維電泳，經 LC-MS-MS 鑑定，再以 degenerate primer 由 mRNA 中分離出相關 cDNA。由這三種方式，共分離出與文心蘭老化相關的基因。目前為止得到下列結果：(1) 可以改變植物開花期的基因。*clone 78* 的產物具有 lipase 的功能，以轉殖阿拉伯芥的方式發現，大量表現 *clone 78* 會延後植物開花的花期，同時會降低 SAG 基因表現，而延緩阿拉伯芥老化。在阿拉伯芥中以 RNAi 的方式抑制 *clone 243* 的活性時，阿拉伯芥的花期會提早。(2) 花朵老化誘導啟動子的發現。*clone 270* 以 RT-PCR 以及 Northern 分析，都發現 *clone 270* 在文心蘭中可以被老化高度誘導，可以推論 *clone 270* 的啟動子是老化誘導啟動子。因此進一步將以文心蘭轉殖的方式，抑制啟動文心蘭開花老化的基因，以延緩文心蘭小花老化。

The cut flower of *Oncidium* 'Gower Ramsey' is one of the most important export flowers in Taiwan. After *Oncidium* flowers are harvested, the operation of classification and package of flowers always results in the dislodgment of pollinia cap. Consequently, ethylene is produced from flowers within hours, and the senescence of flowers is stimulated. Although the massive production of *Oncidium* cut flowers is in the late summer, the senescence of *Oncidium* cut flower is enhanced due to high temperature. Even the application of preservatives, the vase life of *Oncidium* cut flowers only increases for another 3-4 days. Therefore, it is urgent to develop an efficient and safe mean to delay *Oncidium* senescence and decrease flower wilt. The senescence-induced cDNAs were obtained from RNA, isolated from wilting *Oncidium* flower subtracted from totally open flower by RT-PCR. The senescence-induced proteins were also isolated by protein 2D gel, and their corresponding cDNAs were obtained based on their amino acid sequence analyzed by LC-MS-MS. By introducing these genes into *Arabidopsis*, plants with *clone 78* delayed flowering, repressed the expression of SAG gene, and postponed senescence. Also, transgenic plants with RNAi of *clone 243* promoted early flowering. Furthermore, expression of *clone 270*, whose product

has lipase activity, significantly increased in the senescent *Oncidium* by RT-PCR and Northern blotting analyses, and it was assumed that the promoter of clone 270 should be induced by senescence extensively. Finally, transgenic *Oncidium* will be created by introducing the senescence-induced gene identified above.

二、前言：

文心蘭切花廣受消費者歡迎，是臺灣外銷第三大切花，主要市場是日本，因為台灣氣候得宜，在日本市場的文心蘭，有 60%來自台灣。除了日本以外，文心蘭可能外銷至韓國、香港、美洲、及歐洲（李，1997）。目前文心蘭外銷以空運為主，文心蘭採花後插花、分級、套袋、切口重削、插包鮮管、裝箱，其間花枝糾纏，分級時花枝拉扯，使得花藥脫落，數小時內乙烯會產生，花朵會提早老化，所以在冷藏包裝時已有大量落花（黃，1998；林，1999）。冬季文心蘭品質不錯，但是在夏秋盛產期，經過五日儲運後，文心蘭較快老化，瓶插苗壽命偏短為 4-5 日，即使經過繁複的保鮮劑處理也只能達 8 日（林，1998）。因此如何延緩文心蘭老化，降低文心蘭花朵捲曲掉落，是提高文心蘭品質的重要課題。為了研究文心蘭的花老化，根據花瓣的外表型態改變可將文心蘭花期分為 4 個階段：全開未老化的花（+10），唇瓣完全平張；老化初期（-8），老化開始，唇瓣產生紋路，花梗還是綠色；老化中期（-6），唇瓣明顯紋路並開始變薄，花梗變黃綠色；老化末期（-4），唇瓣有深重的紋路並且開始捲曲，花萼枯萎且花梗變黃。過去本實驗室為了得到文心蘭老化誘導基因，抽取老化中期（-6）及全開未老化的花（+10）之 RNA，利用抑制性雜合扣除法（Suppression Subtractive hybridization, SSH），以（-6）時期表現之 RNA 減去（+10）表現之 RNA，鈎取出數個文心蘭老化相關基因 OSAGs

（Senescence-Associated Genes）大約 200~300 bps 的片段，並且利用 RT-PCR 進行進一步的篩選，確認這些基因為老化誘導基因。因為 OSAGs 為老化誘導基因，故推測這些基因可能有兩種功能，可能是促進老化的基因，也可能是可以抵抗老化逆境的基因，因此必須以基因轉殖的方式，藉由觀察轉殖植物的性狀來推測其功能。因為文心蘭的轉殖耗時，因此先以阿拉伯芥的轉殖，作為測試的方法。

本研究計畫主要分為兩部份，第一部份以 differential display 比較和 subtraction library 建立、以及蛋白質二維電泳的方式，分離出可能由老化誘導的相關的 cDNA 片段，經過 semi-quantitative PCR 的進一步確認，以分離出老化誘導的 cDNA 片段。第二部份將以這些老化誘導的 cDNA 片段為探針，由文心蘭 cDNA 中分離出全長 cDNA，也同時以這些老化誘導的 cDNA 片段為探針，由文心蘭 genomic library 中，分離出啟動文心蘭老化的

啟動子。而後將老化誘導基因接上適當啟動子後，轉殖入阿拉伯芥，分析老化誘導基因的生理功能，以決定日後可以轉殖入文心蘭的基因，以達到延緩文心蘭老化之目的。

三、研究目的：

分離出與文心蘭花朵老化相關的基因，抑制啟動文心蘭開花老化的基因，以延緩文心蘭小花老化。

四、研究方法：

RNA 抽取及使用 RT-PCR 和 Real-time PCR 進行 RNA 定量

使用 TRIzol Reagent (Invitrogen) 萃取播種 12 或 40 天的阿拉伯芥 RNA 然後處理 DNaseI (Ambion)，去除 genomic DNA 的污染，避免影響之後進行 RT-PCR 和 Real-time PCR 的結果。Real-Time PCR 使用 SYBR Green PCR Master Mix (ABI)，機型為 ABI PRISM 7500 thermocycler (ABI)。每次實驗都至少進行三重覆。

阿拉伯芥花序浸潤轉殖

將阿拉伯芥種子播於有機培養土中，在 22 °C / 18 °C，16 hr/8 hr 光/暗生長室中培養。挑 *Agrobacterium* 單一菌落，培養在含適當抗生素之 LB 培養液中。取阿拉伯花序剪掉果莢及已開的花做為材料。

Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

使用 CLONTECH 公司所出品的 SMART RACE cDNA Amplification Kit，釣取基因的 5' 和 3' 端未知片段。

五、研究結果及討論：

延緩植物老化機制的研究

在阿拉伯芥中大量表現 *clone 78* 可以延後花期、延緩花朵老化、以及延緩植物老化，因此將進一步研究 *clone 78* 的功能。由序列比對得知，*clone 78* 有 lipase 的活性，並且會造成植株缺乏賀而蒙 GA，因此初步推論因為缺乏賀而蒙 GA，造成開花調節基因 *SOC1* 減少表現，而使得花期延後。但是 hydrolase 和 GA 的關係則不清楚，因此 hydrolase 如何影響 GA 將被研究。同時也將研究 wild type 阿拉伯芥和 35S::OSAG78 轉殖阿拉伯芥中不同 GA 的含量，並且以噴灑 GA 的方式，觀察 35S::OSAG78 轉殖阿拉伯芥的花期

和老化，是否回復正常。並且將分析 35S::OSAG78 轉殖阿拉伯介中老化誘導基因 SAG 的表現，以瞭解 *clone 78* 的表現和 SAG 的關係。

花期提前機制的研究

在阿拉伯介中以 RNAi 的方式抑制 *clone 243* 的活性，會降低開花基因 *FLC* 的活性，發現不會影響阿拉伯介的花型和植株大小，但是可以提早開花。由序列比對得知，*clone 243* 有 C3HC4 RING domain，因而調節開花基因 *FLC* 的活性，所以抑制 *clone 243* 的活性，會使得開花基因 *FLC* 的活性降低。這個假設仍需以分析 wild type 阿拉伯介和 *clone 243* RNAi 的阿拉伯介中的狀態來證實。因為 *clone 243* 可以在阿拉伯介資料庫中找到相關的基因，所以已經購買阿拉伯介的 C3HC4 RING domain 蛋白質的 T-DNA insertion 種子，將分析此 T-DNA insertion 阿拉伯介是否和 *clone 243* RNAi 阿拉伯介有一樣的性狀。

老化誘導啟動子的分析

Clone 270 為文心蘭所特有的基因，以 RT-PCR 分析以及以 Northern 分析，發現 *clone 270* 在文心蘭中可以被花朵老化高度誘導，因此 *clone 270* 啟動子是一個花朵老化誘導的啟動子，此啟動子值得進一步分析；此外 *clone 78* 和 *clone 243* 的表現可以被老化誘導，因此他們的啟動子在文心蘭中也應該是老化誘導啟動子。這些的啟動子的部份序列已經以 TAIL PCR 獲得，更長的序列仍需要以 TAIL PCR 或 genomic walking 獲得。有全長啟動子後，再接上報告者基因，例如 GFP 或 GUS，轉殖入阿拉伯介，分析阿拉伯介老化時，啟動子是否會啟動報告者基因，甚至以啟動子系列刪減的方式，確定啟動子上老化誘導的 cis element。

六、參考文獻：

Bekman, E. P., Saibo, N. J. M., Cataldo, A. D., Regalado, A. P., Ricardo, C. P., Rodrigues-Pousada, C. (2000) *Planta* 211, 663-572.

Chen, J. T., Chang, W. C. (2000) *Plant Science* 160, 87-93.

Chen, J. T., Chang, W. C. (1999) *Plant Cell Reports* 19, 143-149.

Gellatly, K. S., Ash, G. J., Taylor, J. L. (2001). *Canadian J. of Microbiology*.47,955-960.

Goda, S. K., Minton, N. P. (1995) *Nucleic Acids Research*,. 3357-3358.

Goh, C. J., Halevy, A. H., Engel, R., Kofranek, Y. (1985) *Scientia Hort.* 26, 57-67.

Hamilton, A.J., Lycett, G. W., Grierson, D. (1990) *Nature* 346, 284-287.

He, Y. and Gan, S. (2002).. *Plant Cell*, 14, 805-815.

Henskens, H., Somhorst, D., Woltering, E. J. (1993) Cellular and molecular aspects of the plant hormone ethylene, pp323-324.

Hoegh, A. M., Hviid, T. V. F. (2001) *Biotechniques* 31, 2001. 730-734.

Jeng, S. T., Yen, C. Y. (2000) *Physiol. Plant.* 108, 171-179.

Kamo, K., Blowers, A., Smith, F., Van Eck, J. (1995) *Plant Science* 10, 105-111.

Kende, H. (1993) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*44, 283-307.

Nakajima, N., Mori, M., Yamazaki, K., Imaseki, H. (1990) *Plant Cell Physiol.* 31, 1021-1029.

Picton, S., Barton, S. L., Bouzayen, M., Hamilton, A. J., Grierson, D. (1993) *Plant J.* 3, 469-481.

Saks, Y., Van Staden, J.(1992) *Plant Growth Regul.* 11, 45-51.

Van Doorn, W. G., Woltering, E. J. (1991) *Acta Hortic.* 298, 195-208.

Wang, H., Woodson, W. R. (1991) *Plant Physiol.* 89, 434-438.

Woodson, W. R., Lawton, K. A. (1988) Plant Physiol. 87, 498-503.

Yang, S. F., Hoffman, N. E. (1984) Annu. Rev. Plant Physiol. 35, 155-189.

計畫成果自評

研究內容與原計畫相符，已分離出數個和花朵老化相關的基因，現正進行基因功能分析，希望能對於文心蘭花朵老化有所瞭解，研究成果適合在學術期刊發表，並且有一個老化啟動子已經提出專利申請。