

2017 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 060013

參展科別 植物學

作品名稱 文心蘭 LhPRS 基因參與花被發育調控之功能分析

得獎獎項 大會獎：三等獎

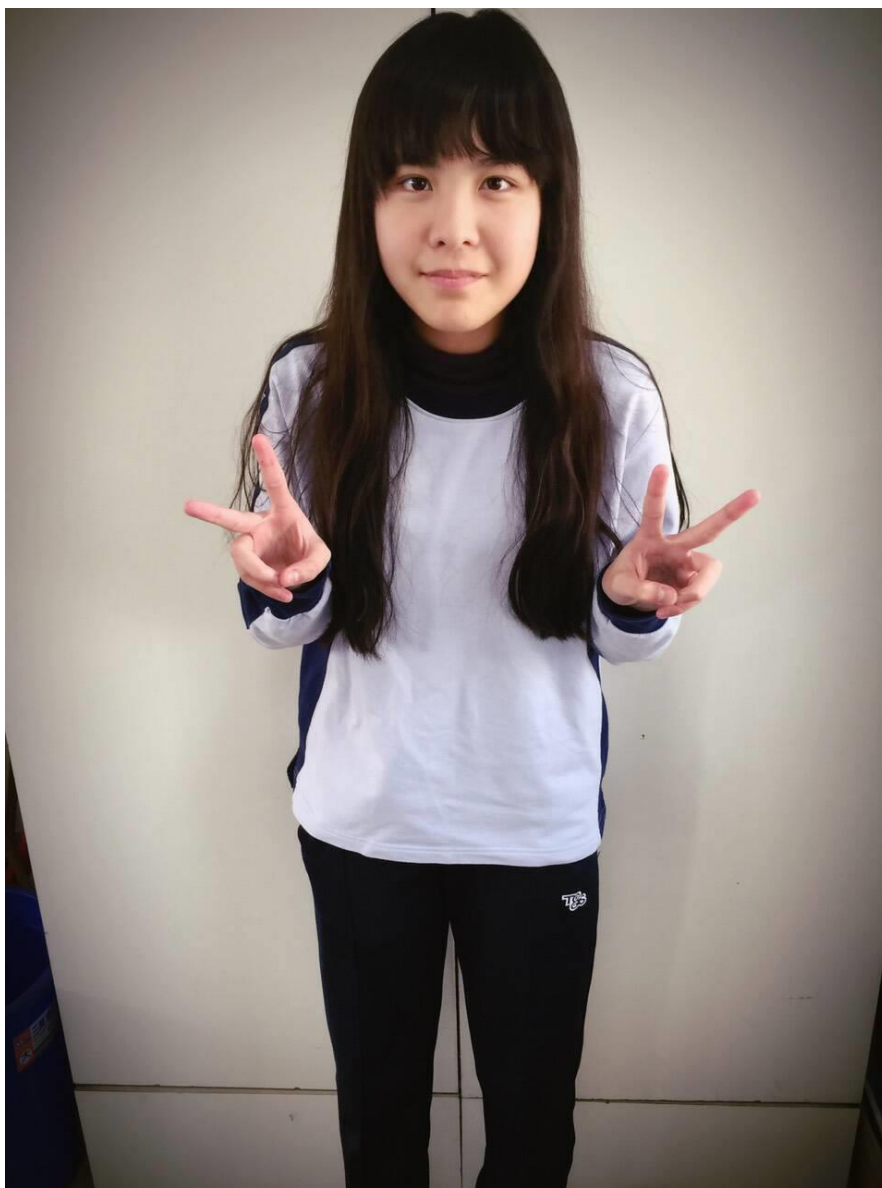
就讀學校 國立臺中女子高級中學

指導教師 楊長賢、呂億真

作者姓名 陳佳平

關鍵字 文心蘭、PRS 基因、花被發育

作者簡介



我是陳佳平。目前就讀台中女中數理資優班二年級，自小受到家人的影響，喜歡閱讀科學人等科普雜誌，閒暇之餘也跳舞、讀科幻小說。藉著對蘭花的喜愛，選定作為嚮往的專題研究，過程十分累人，但最終看見美麗的結果，內心的感動是真的無法磨滅的，也十分感謝這份美好能為我所體驗。希望日後能從事研究工作，為科學盡一份心力。

摘要

為了找出調控蘭花花瓣與唇瓣分化的基因，本研究分析文心蘭品系檸檬文心花瓣與唇瓣轉錄體之次世代高通量定序資料庫，篩選出一 *PRESSED FLOWER (PRS)* 同源基因，命名為 *LhPRS*。為了驗證 *LhPRS* 基因於花被之表現量，透過 qRT-PCR 分析，顯示 *LhPRS* 基因表現量集中在唇瓣，而在花萼與花瓣表現量較低，推測 *LhPRS* 對調控唇瓣發育有其重要性。為了進行後續基因功能性的分析，自唇瓣的 cDNA 選殖出 *LhPRS* 之編碼區序列，包含 606 個鹼基對，可轉譯出 201 個胺基酸。透過兩種不同系統之病毒誘導基因靜默技術，分析 *LhPRS* 基因表現被抑制時對文心蘭花朵發育之影響。結果發現當 *LhPRS* 基因在唇瓣表現量受到明顯抑制時，將使文心蘭花朵唇瓣形態產生變異而失去兩側對稱性，顯示 *LhPRS* 基因具有調控文心蘭唇瓣形態的分化並維持花被生長對稱性的功能。此研究發現將有助於應用在蘭花產業對花型調控與改造的需求上。

Abstract

To identify the gene that regulates the differentiation of lips and petals in orchid flowers, we analyzed NGS data from perianths of *Oncidium* Lemon Heart and focused on *LhPRS*, a *PRESSED FLOWER (PRS)* homologue. By quantitative real-time PCR, we detected that *LhPRS* mRNAs accumulate abundantly in lips, but relatively low in sepals and petals. We supposed that *LhPRS* plays a significant role in regulating development of lip. For subsequent analysis of gene function, we designed specific primers according to *LhPRS* sequence from NGS database to clone the coding sequence of *LhPRS* from cDNAs of lip. The open reading frame of *LhPRS* includes 606 bps and encodes 201 amino acids. To verify the function of *LhPRS* in flower development, we suppressed the expression of *LhPRS* by two different Virus-Induced Gene Silencing (VIGS) systems, pCymMV-Gateway and pTRV2-MCS. We observed the differentiation disorder of lip morphology and the loss of floral symmetry due to the knockdown of *LhPRS* in lips. This preliminary finding can be applied in the flower shape regulation and modification and meet the needs of the orchid industry.

壹、前言

一、植物花器發育的機制

植物生活史可分為胚胎期 (embryonic phase)、營養期 (vegetative phase) 及生殖期 (reproductive phase) 三個階段。植物經過開花誘導自營養期進入生殖期，其中生殖期可再細分為花序期 (inflorescence phase) 與花器期 (floral phase)，兩者之間隔稱為開花啟始 (Coen and Meyerowitz, 1991)。植物花朵之發育是由花器分生組織 (floral meristem) 發育而成，其中花器之發育稱為花器形成。植物透過匯集於花器分生組織基因之訊息，活化與花器初始發育相關之基因，方構築成花 (Blázquez, 2000)。

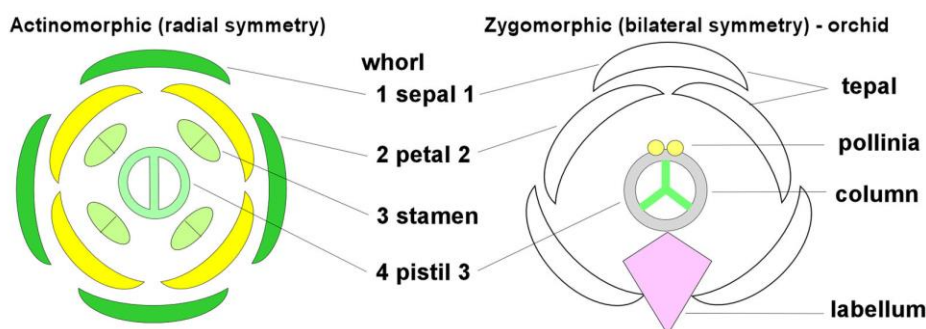
花朵分生組織辨識基因 (floral meristem identity genes)，包含 *LEAFY (LFY)*、*APETALA1 (AP1)*、*APETALA2 (AP2)*、*CAULIFLOWER (CAL)*，為參與花器發育初始的基因，表達於未成熟花之原生基質組織，控制花之形態發育與原基質之專一性 (Coen and Meyerowitz, 1991)。自花器發育起始進入花器形成時，花器辨識基因決定花器原生基質形成四層同心環狀之輪生體，作為花器的基本組成。模式植物阿拉伯芥外層有四片葉狀花萼 (sepal)，以保護內部花芽組織；向內為四片花瓣 (petal)；再向內為雄蕊及最內層的雌蕊組成 (Krizek and Fletcher, 2005)。

二、文心蘭的花朵特性

文心蘭為蘭科文心蘭屬複莖地生蘭或著生蘭，原產於熱帶美洲之墨西哥、巴西及玻利維亞一帶，為多年生植物，有跳舞蘭、金蝶蘭、瘤瓣蘭等別稱，以其唇瓣基部的瘤狀突起得名，又因花形似穿著裙子跳舞的女郎而另稱舞女蘭。具有卵形、紡形、圓形或扁圓形之偽莖，其生育特性為其營養繁殖形態；偽莖是其養份儲存及供給之所在，隨營養生長而增大而隨生殖生長而縮小 (張允瓊、李晔，1999)。

如下圖所示，一般典型的完全花多為輻射對稱 (actinomorphic) 的花型，最外輪為花萼，向內為花瓣，中間由雄蕊與雌蕊組成；而文心蘭花朵構造為兩側對稱 (zygomorphic)，最外層有三片花萼，分為一片背側花萼與兩片側生花萼，內側則有三片花瓣，最下方之花瓣特化成

與其他兩片花瓣相異的形狀、大小和質感，稱為唇瓣 (Lip, labellum) (Cozzolino and Widmer, 2005; Su *et al.*, 2013)。



典型花與蘭花花朵對稱性的比較 (Su *et al.*, 2013)。

文心蘭檸檬文心 (*Oncidium Lemon Heart*) 乃是一日本品種，登錄於英國皇家園藝學會 (<https://www.rhs.org.uk>)，也是臺灣文心蘭切花外銷品種中相當普遍的一種。此品種之特色在其花瓣及花萼上有淡褐色條紋，唇瓣上的瘤狀突起有褐色斑塊，開花期長，觀賞價值高，頗受到日本人的喜愛，且檸檬文心比普通文心蘭的價格高出一倍，瓶插壽命也較長。外觀上唇瓣之大小明顯大於花萼、花瓣，邊緣有裙裾狀皺褶，質感也較花瓣更為厚實。



文心蘭檸檬文心花朵外觀。

三、與花朵發育相關之 *PR5* 基因研究

阿拉伯芥中與 *PR5* 相關的 *WUS* 基因表現於莖頂分生組織 (SAM, shoot apical meristem)，具有決定細胞增生和花朵發育過程的功能；而於 *wus* 突變株的花朵中也出現雄蕊減少、花被

消失等情形 (Laux *et al.*, 1996)。

阿拉伯芥 *PRS* (*PRESSED FLOWER*) 屬於 *HOX* 基因群中的 *WUSCHEL-related homeobox 3* (*WOX 3*) 基因，cDNA 序列包含 864 個鹼基對。*HOMEODOMAIN* 蛋白以擁有 *HOMEODOMAIN* 為特色，至少有 14 群以上的演化分支，在植物發育中扮演重要角色。*HOMEODOMAIN* 平均由 60 個胺基酸構成，以三個 α 螺旋組成疏水性中心，具有辨識並結合 DNA 之功用 (Wolberger, 1996)。

PRS 表現於早期的葉原基 (young leaf primordia)、花原基 (floral primordia) 及花器原基 (floral organ primordia) 的側邊區域，被認為有調節側軸器官或組織生長之功能，參與調控阿拉伯芥花朵中軸兩側之對稱性及花器原基的形成 (Matsumoto and Okada, 2001)。*PRS* 基因突變會影響側邊花萼的生長，使其出現細小突起。突變植株仍能夠生長出次生幼年組織，但因組織架構嚴重失序以致無法繼續生長甚至完全消失，導致扁平狀外觀的花朵的出現；經由異位表現和大量表現 *PRS* 基因，則發現其具有促進細胞增生之功能。另有研究指出，單子葉和雙子葉植物中 *PRS* 蛋白對於調控花器發育的功能應相當具有保守性 (Costanzo *et al.*, 2014)。

四、病毒誘導基因靜默技術

病毒誘導基因靜默技術 (VIGS) 利用重組病毒產生 RNA 干擾 (RNAi, RNA interference) 的現象，由核酸內切酶 Dicer 將細胞中的雙股 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 切成許多小片段，產生小分子干擾 RNA (siRNA, small interfering RNA)。當許多 siRNA 結合到與其序列互補的 RNA 上形成雙股 RNA 後，將引發一連串的雙股 RNA 降解、合成與放大作用，使該特定基因表現受到靜默。

VIGS 技術廣泛應用於植物基因功能的鑒定，具備專一性、能夠簡單並快速地靜默基因、毋須建立穩定的植物轉殖系統、只需部分序列資訊就能夠進行基因靜默等優點。VIGS 載體有許多種，目前較常利用的病毒載體有 Apple latent spherical virus (ALSV)、Barley stripe mosaic virus (BSMV) 與 Tobacco rattle virus (TRV) 等 (Sun *et al.*, 2014)。

貳、研究動機

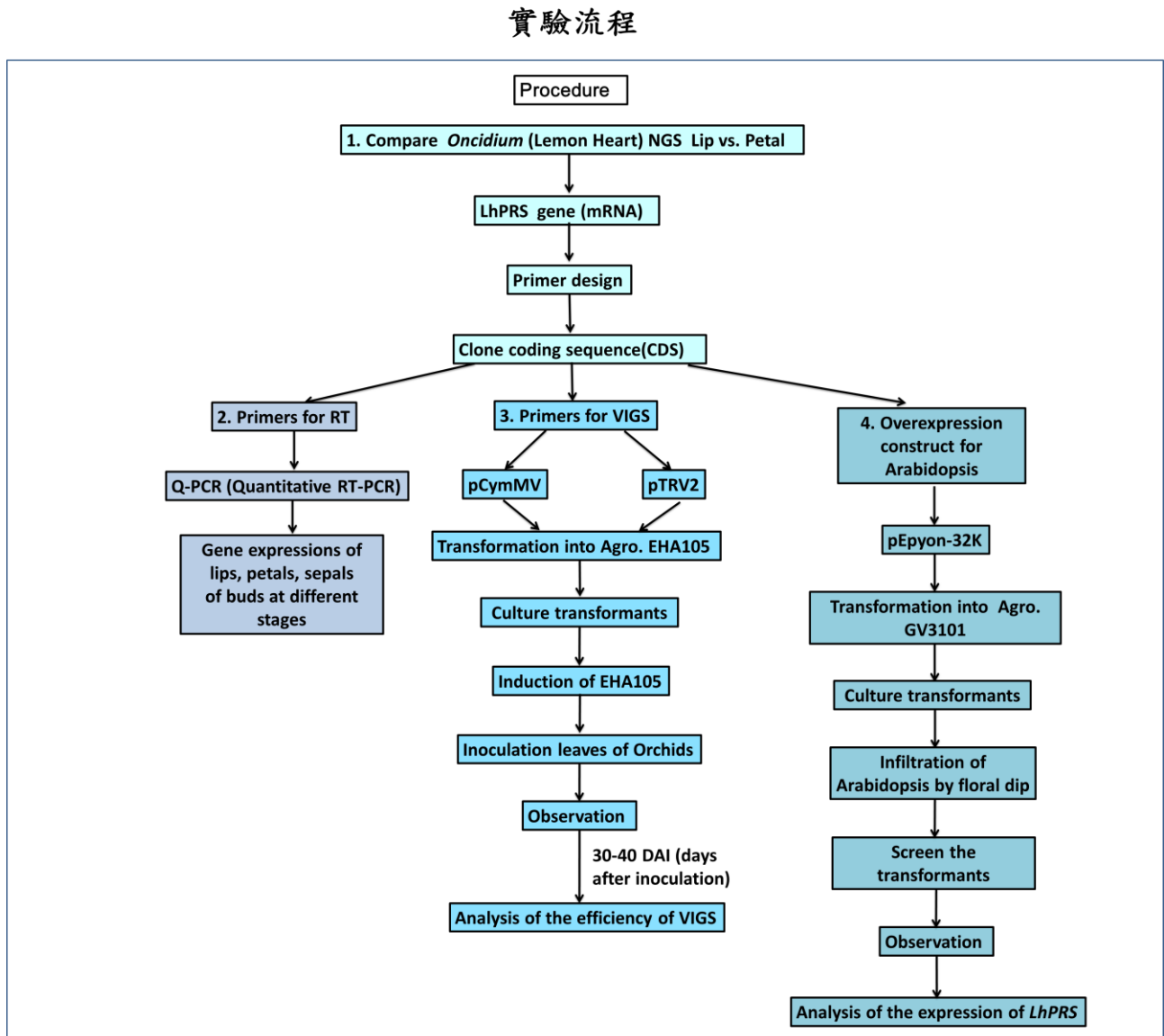
蘭花的唇瓣由花瓣特化而來，卻與花瓣的大小與形態上具有顯著的差異，在質地、色素分布、光澤等特徵上也不盡相同。閱讀相關文獻與日常觀察發現，多數蘭花在花朵未綻放前，花器於花苞內的分布為唇瓣在上，兩片花瓣在下；但在花苞即將展開前，其細長的子房與花梗會旋轉 180 度，使唇瓣與蕊柱的位置上下顛倒，唇瓣變為背軸位相，位在蕊柱下方，成為我們平日所見的唇瓣在下的蘭花花朵，稱之為轉位現象 (*resupination*)。以唇瓣與最上方之一片花萼的連軸為對稱軸心，兩側各有一片花瓣與花萼，賦予了蘭花兩側對稱的花型。我們對蘭花花朵成形的過程感到興趣，並推測是受到基因調控而造成花朵的特異性，因此本研究欲以文心蘭為研究對象，經由基因層面之探討，瞭解調控唇瓣和花瓣分化與蘭花花朵對稱性的機制。

參、研究目的

- 一、分析文心蘭品系檸檬文心中花瓣與唇瓣轉錄體之次世代高通量定序資料庫，篩選出調控唇瓣特化之基因並進行選殖。本研究之目標基因為 *LhPRS*。
- 二、偵測 *LhPRS* 基因在花被各部位不同時期之基因表現量，以了解 *LhPRS* 於花朵發育的不同時期參與的程度。
- 三、利用病毒誘導基因靜默技術抑制 *LhPRS* 基因表現量，觀測 *LhPRS* 基因於花被發育的重要性。
- 四、透過轉基因阿拉伯芥，在不同時期以大量表現 *LhPRS* 基因的方式，觀察其於特定部位之性狀變化與花器發育之參與程度。

肆、研究過程與方法

一、實驗流程



圖一、*LhPRS* 基因之研究架構與流程。

本研究之實驗架構與流程如下：首先根據文心蘭花被轉錄體次世代高通量定序資料庫 (NGS database)，比較 *Oncidium* Lemon Heart 的唇瓣與花瓣之基因表現數據，篩選出 *LhPRS* 基因作為研究目標。依照 NGS 資料庫的序列設計 *LhPRS* 專一性引子，自唇瓣的 cDNA 選殖出 *LhPRS* 之編碼區序列 (coding sequence, CDS)，以作為後續 VIGS、Q-PCR 與轉基因阿拉伯

芥實驗設計引子之模版。Q-PCR 的實驗以 *LhPRS* 專一性引子，偵測不同時期花苞（長度分別為 3 毫米、6 毫米、10 毫米）與成熟花之各部位花被，包括唇瓣、花瓣與花萼中該基因之表現變化。另一方面，進行建構 TRV 與 CymMV 兩種 VIGS 系統所需之構築體，將完成的構築體一一轉入農桿菌 EHA105。轉形成功的農桿菌經過培養與活性誘導，用於接種文心蘭花序正下方第一片葉子。接種後 30-40 天進行花朵形態的觀察與記錄，並採收花被組織，抽取 RNA 以供基因表現量分析。另外將 *LhPRS* 之編碼區序列建構於表現載體 pEpyon-32K，將完成的構築體轉入農桿菌 GV3101，將菌液滴於阿拉伯芥花朵上進行感染，待開花後觀察花朵型態，並採收葉片組織，抽取 RNA 以供基因表現量分析（圖一）。

二、實驗方法

（一）植物材料

1.文心蘭: 本研究所使用的材料為文心蘭檸檬文心 (*Oncidium Lemon Heart*)，是臺灣文心蘭切花外銷品種中相當普遍的一種，花朵為金黃色，具有花梗長、花序分支多、花朵數目多、生長溫度範圍廣、花期長等特色。檸檬文心栽種於溫室中，室內溫度控制在 25 °C。

2.阿拉伯芥: 本研究所使用的材料為野生型阿拉伯芥哥倫比亞生態型 (*Arabidopsis thaliana* ecotype *Columbia*) (Col-0)，由 Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC, the Ohio State University, OH, USA) 提供。

（二）總量核糖核酸 (Total RNA) 之萃取

將研鉢及杵用鋁箔紙包裹好，在 180°C 高溫情況下連續乾熱 10 小時以上，其他塑膠器具則利用滅菌釜濕熱滅菌 2 次，以去除核糖核酸酶 (RNase)。將 0.1g 文心蘭材料置入研鉢，加入適量液態氮研磨成粉末。加入 1 ml TRIzol® reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA) 混合均勻，於 4 °C 以 12,000 rpm 離心 10 分鐘後將混合液吸入 1.5 ml 微量離心管中，加入 0.2 ml 氯仿 (chloroform) 劇烈搖晃 15 秒後，冰浴 5 分鐘，再於 4 °C 以 12,000 rpm 離心 15 分鐘。離心後取上清液 0.5 ml 至新的 1.5 ml 微量離心管，加入 0.5 ml 的異丙醇 (isopropanol) 混合均勻，置於 4 °C 下 30 分鐘，以利 RNA 的沉澱，再於 4 °C 以 12,000 rpm 離心 10 分鐘，移除上清液。在管中加入 1 ml 75%酒精並搖晃均勻，於 4 °C 以 8,000 rpm 離心 5 分鐘。移除

酒精並將沉澱物真空乾燥後，加入 20 μ l 雙乙基焦炭 (diethylpyrocarbonate, DEPC) 處理過的二次水溶液，置於 55 °C 水浴槽中回溶 30 分鐘。最後以 4 °C、12,000 rpm 離心 5 分鐘，取上清液置入新的 1.5 ml 微量離心管，即可得總量 RNA。取 2 μ l RNA，進行 1% 瓊脂凝膠電泳，剩餘之 RNA 則儲存於 -80 °C 冷凍庫供日後使用。

(三) 反轉錄作用 (Reverse transcription, RT)

取 4 μ l 的 RNA 於 0.2 ml 的離心管中，並加入 20 μ M 的 oligo d (T) primer 1 μ l，置放入熱循環機，70 °C/5 分鐘後再置於 4 °C/5 分鐘，反應完成後，再分別加入 4.5 μ l DEPC-treated ddH₂O、4 μ l ImProm-IITM 5 \times Reaction Buffer、4 μ l 的 25 mM MgCl₂、1 μ l 的 10 mM dNTP mix (dATP、dTTP、dCTP、dGTP)、0.5 μ l 的 20 unit Recombinant RNasin[®] Ribonuclease Inhibitor (Promega, Madison, WI, USA) 及 1 μ l 的 ImProm-IITM Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) 混合均勻，於熱循環機進行反應，依序 25 °C/5 分鐘、42 °C/90 分鐘及 70 °C/15 分鐘，完成後得 cDNA，儲藏於 -20 °C 冰箱，或以 cDNA 為模板進行聚合酶鏈鎖反應。

(四) 膠體電泳 (Electrophoresis)

秤取 1 g 瓊脂 (agarose) 置於 500 ml 之錐形瓶中，加入 100 ml 的 1 \times TAE buffer (40mM Tris-acetate 與 1mM EDTA)，配製成 1% 瓊脂凝膠。將瓊脂凝膠膠片置於電泳槽中，加入 1 \times TAE buffer。取適量樣品，加入 2 μ l 的 10 \times loading dye (0.25% xylene cyanol FF、0.25% bromophenol blue 與 30% glycerol) 於其中，混合均勻後注入瓊脂凝膠膠片之凹槽 (well) 中，以 100 V 的電壓進行電泳，時間約 23 分鐘，將膠片置於溴化乙錠 (ethidium bromide, EtBr) 染盆中進行染色，於水中退染 10 分鐘後，將其置於 UV 燈箱中觀察，並以照相設備擷取膠圖，並對照 DNA marker (GeneMarker Technology Co., Ltd.) 計算片段大小與濃度。

(五) 即時定量聚合酶連鎖反應 (Quantitative Real-time PCR, Q-PCR) 分析

於目標基因及管家基因 (house-keeping gene) 上設計 Real-time PCR 專一性引子。LhPRS

之專一性引子為 *LhPRS* -RT-F 與 *LhPRS* -RT-R；文心蘭管家基因 *OnAT* 之專一性引子為 *OnAT*-RT-3 與 *OnAT*-RT-4。以 SYBR Green 來標定 PCR 產物，SYBR Green 可嵌入雙股 DNA 之次溝槽 (minor groove)，經由螢光激發後發出綠色螢光，透過 Real-time PCR 機器偵測每次增幅後的螢光值，經由軟體 (BioRad CFX Manager) 找出閾值 (達到某特定螢光強度所需要的循環次數) 作為定量依據。待測基因表現量以管家基因之表現量校準後，得到表現量之相對值。首先取 4 μ l 樣品之 cDNA，依序加入 7.5 μ l KAPA SYBR FAST quantitative (q)PCR Master Mix Universal (KAPA Biosystems)、0.4 μ l 之 forward primer、0.4 μ l 之 reverse primer，補充二次蒸餾水 2.7 μ l 至體積 15 μ l，以熱循環機 Mini Opticon Real-Time PCR Detection System (Bio-RAD) 偵測 SYBR Green 螢光值，反應條件為 95 °C / 1 分鐘，接著以 95 °C / 15 秒、58°C / 15 秒，72 °C / 30 秒進行 40 個循環。每一樣本重複三次反應，由軟體計算分析後即可得到相對表現量。

(六) 聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR)

取 4 μ l 反轉錄合成所得之 cDNA 入 34 μ l 之二次蒸餾水、5 μ l 10 \times buffer、5 μ l 的 2.5 mM dNTP mix、0.5 μ l 的 10 μ M forward primer、0.5 μ l 的 10 μ M reverse primer 及 1 μ l 的 Advantage II polymerase，使總體積達到 50 μ l。以微量吸管混合均勻後，置於熱循環機中進行增幅反應。先進行 96 °C / 5 分鐘，再以 96 °C / 45 秒、57°C / 45 秒、72 °C / 45 秒為一循環，進行 35 個循環，最後經過 72 °C / 10 分鐘後結束反應，並以 1% 瓊脂凝膠片進行膠體電泳分析。

(七) DNA 片段純化與回收

本實驗使用 DNA clean/Extraction Kit (GENEMARK, Taiwan)。先將欲純化之 DNA 片段或利用限制酶 (TaKaRa, Shiga, Japan) 截切之質體 DNA，以 1% 瓊脂凝膠片進行電泳，將目標片段從膠片上切下後，置入 1.5 ml 微量離心管中，加入樣品 2 倍體積之 Binding buffer，置於 55-60 °C 水浴槽中充分溶解 10-15 分鐘，溶解後置於室溫冷卻。將過濾管柱置於 2 ml 集液管，加入先前的回收物，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘後去除集液管之流出液。加入 700 μ l Wash buffer (含酒精) 於過濾管柱內，同樣以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，並去除集液管之流出

液，再以 13,000 rpm 離心 10 分鐘使 Wash buffer 完全去除。將過濾管柱置於 1.5 ml 微量離心管中，加入 30-50 μ l 的無菌二次水於管柱過濾膜上，靜置 2-3 分鐘使 DNA 充分回溶後，以 13,000 rpm 離心 2 分鐘，即可得純化之 DNA 片段。

(八) 接合反應 (Ligation)

取進行完 PCR 之產物，加入 0.5 μ l 的 pGEM[®]-T Easy vector (Promega, Madison, WI, USA)，使兩者之體積比為 3:1，加入等體積接合酵素溶液 (DNA ligation kit) (TaKaRa, Shiga, Japan)，混合均勻後置於 16 $^{\circ}$ C 水浴槽中反應 16 小時，完成接合反應。

(九) 細胞轉形作用 (Transformation)

取 100 μ l 勝任細胞置於冰上解凍，加入已完成接合反應之 DNA 接合產物，冰浴 30 分鐘，再以 42 $^{\circ}$ C 熱處理 (heat shock) 90 秒，迅速移回冰上並靜置 5 分鐘。在無菌操作台內加入 0.5 ml 的 LB 液態培養基，於 37 $^{\circ}$ C 以 200 rpm 震盪培養 1 小時後，分別取 200 μ l 轉形完成之菌液、100 μ l 的 0.1 M IPTG 以及 20 μ l X-gal (50 mg/ml) 混勻後，塗在含有青黴素(100 μ g/ml ampicillin) 之 LB 固態培養基上，置於 37 $^{\circ}$ C 恆溫培養箱中培養 16 小時。

(十) 篩選菌落之聚合酶鏈鎖反應 (Colony PCR)

使用牙籤挑取培養 16 小時之菌落，置於 0.2 ml 微量離心管中，依序加入 2 μ l 10 \times buffer、1.5 μ l 的 2.5mM dNTP mix、0.3 μ l 之 forward primer、0.3 μ l 之 reverse primer 及、0.3 μ l 的 Taq DNA polymerase (MDBio, Taiwan)，補充無菌去離子水至總體積為 20 μ l，混合均勻後放入熱循環機中進行 PCR 反應。反應條件如下：96 $^{\circ}$ C/5 分鐘，接著以 96 $^{\circ}$ C/30 秒、58 $^{\circ}$ C/45 秒、72 $^{\circ}$ C/1 分鐘進行 35 個循環，最後在 72 $^{\circ}$ C/10 分鐘後結束反應。PCR 反應結束後之產物，以 1% 瓊脂凝膠進行電泳分析。

(十一) 高純度小量質體 DNA 之抽取

使用 Plasmid Miniprep Purification Kit (GENEMARK, Taiwan) 抽取質體 DNA。選取含目

標質體的單一菌落，培養於 5 ml 含有青黴素 (100 µg/ml ampicillin) 之 LB 液態培養基，放置於 37 °C 恆溫培養箱，以 200 rpm 搖晃培養 14-16 小時後，將菌液以 13,000 rpm 離心 1 分鐘收集菌體。倒掉上清液，加入 200 µl 的 Solution I buffer (含 RNase A) 於微量離心管懸浮菌塊，再加入 200 µl 的 Solution II buffer 溫和搖盪至溶液澄清，最後加入 200 µl 的 Solution III buffer 溫和搖盪混勻，以 13,000 rpm 離心 10 分鐘。將過濾管柱置於 2 ml 集液管，吸取離心後之上清液並加入集液管中。13,000 rpm 離心 1 分鐘，倒掉集液管中的濾液。加入 700µl Wash buffer 至過濾管柱內，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘後，除去濾液，再以 13,000 rpm 離心 5 分鐘，使 Wash buffer 完全去除。最後將過濾管柱置於新的 1.5 ml 微量離心管中，並在過濾膜上加入 50µl 的無菌二次水，靜置 2-3 分鐘使 DNA 充分回溶後，以 13,000 rpm 離心 2 分鐘，即可得到高純度的質體 DNA。

(十二) 限制酶截切 (Restriction enzyme digestion)

取 50 µl 質體 DNA 或 DNA 片段至 1.5 ml 微量離心管中，依序加入 39 µl 無菌二次水、5 µl 10× buffer 和 3 µl 限制酶(15 units/ µl)，混合均勻後置於 37 °C 反應 3 小時，再利用瓊脂凝膠電泳分析 DNA 片段。

(十三) 序列排比與演化樹的繪製

利用 Bioedit 軟體 (Hall, 1999) 之 ClustalW Multiple Alignment 可進行序列排比。演化樹的繪製則透過線上基因序列分析網站 DDBJ (DNA Data Bank of Japan, <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>)，輸入長約 63 個胺基酸之 HOMEODOMAIN 序列，以 ClustalW 進行多重序列排比，並以 Neighbor-Joining (NJ) 方法演算得到 bootstrapped tree file，將 bootstrapped tree file 輸入 TreeView v.1.6 軟體繪出演化樹圖形。

(十四) 阿拉伯芥之基因轉殖與篩選轉基因植物

1. 農桿菌快速冷凍轉型 (Freeze-thaw method)

將 5 µg 欲轉型之質體 DNA 加入農桿菌勝任細胞 GV3101(由實驗室製備)中，均勻混合後放置冰上 5 分鐘，之後迅速置於液態氮中急速冷凍 5 分鐘，再放置於 37 °C 水浴槽中回溫 5 分鐘，加入 1 ml LB 液態培養基於 28 °C 以 200 rpm 連續震盪培養 4 小時，將菌液塗抹在含有抗生素 kanamycin(100 µg/ ml)與 gentamycin (15 µg/ ml)之培養基中，並於 28 °C 中培養 2 天。取生長之菌落進行 colony PCR 鑑定質體是否成功轉入。

2.阿拉伯芥之轉殖

培養 50 ml 含有轉殖基因質體之農桿菌菌液，於 28°C 連續震盪培養 2 天，將菌液以 5000 rpm 離心 10 分鐘，並將農桿菌均勻混合於 50 ml 之 Inoculation medium (1/2 MS pH5.7、0.5 % sucrose、0.05 % silwet L-77 及 44 nM BAP) 中，以塑膠滴管取出菌液，滴於所有阿拉伯芥的花苞上，而後放入置物箱中，以保鮮膜密封，置於 22 °C 且長日照處理的恆溫生長箱 (16 小時光照/8 小時黑暗) 中培養 2 天，2 天後將植物自置物箱取出培養，待植物結果莢收取種子。

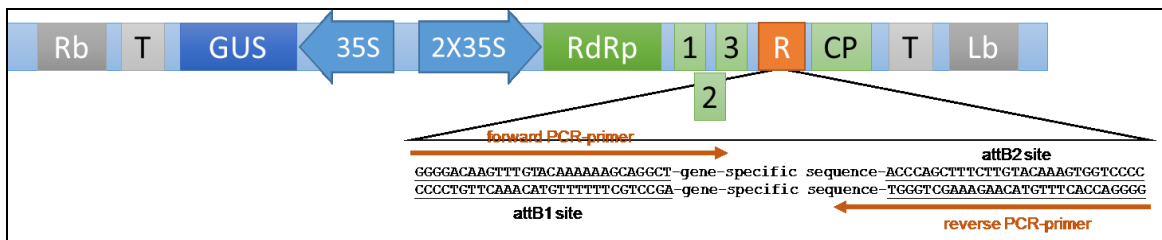
3.快速大量篩選轉基因阿拉伯芥植株

將欲篩選之種子置於 15 ml 離心管中，於 15 分鐘內以 solution A (70 % EtOH、0.05 % Triton X-100)洗滌種子 3 次，再以 solution B (95 % EtOH)於 15 分鐘內清洗 3 次，將滅菌後的種子置於乾燥無菌之濾紙上，待酒精完全揮發，再將種子灑於含 50 µg/ ml kanamycin 的 MS 固態培養基上，約一周後能正常發育的植株，即為轉殖植株。

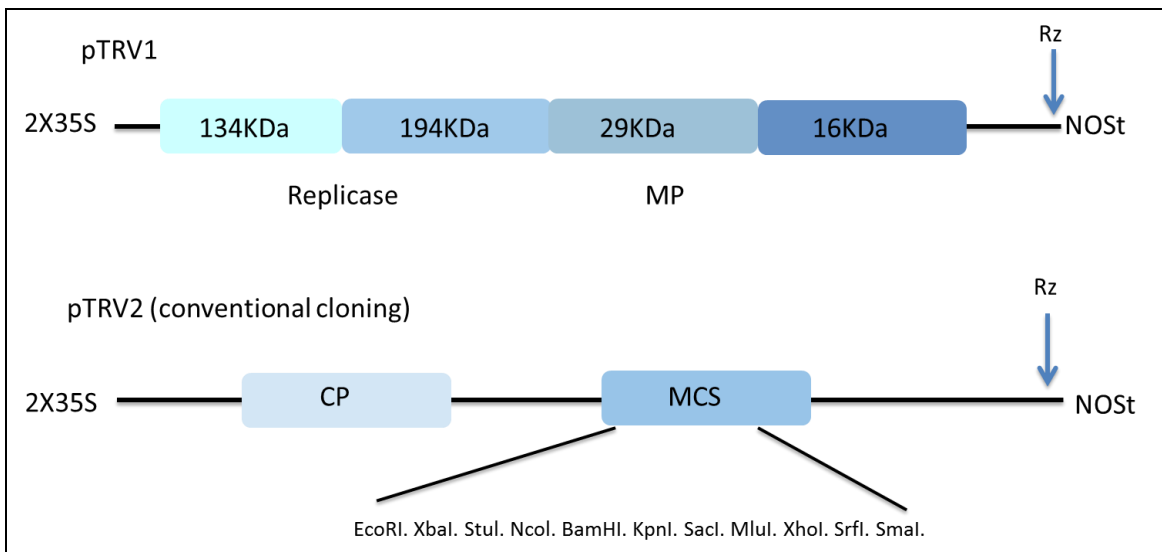
(十五) 病毒誘導基因靜默技術

選用病毒誘導基因靜默技術中的 TRV 系統與 CymMV 系統，分別製作構築體。將 *LhPRS* 特定片段接至兩種不同系統之病毒表現載體 pCymMV-Gateway (圖二，Hsieh *et al.*, 2014) 以及 pTRV2-MCS(圖三)。設計引子對 *LhPRS*-Cym-F 與 *LhPRS*-Cym-R 放大 *LhPRS* 150 bp 片段，引子上設計 *attB1* 與 *attB2* 序列，使用 Gateway® BP Clonase II Enzyme Mix (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)，可將 *LhPRS* 150 bp 片段接入 pCymMV-Gateway，完

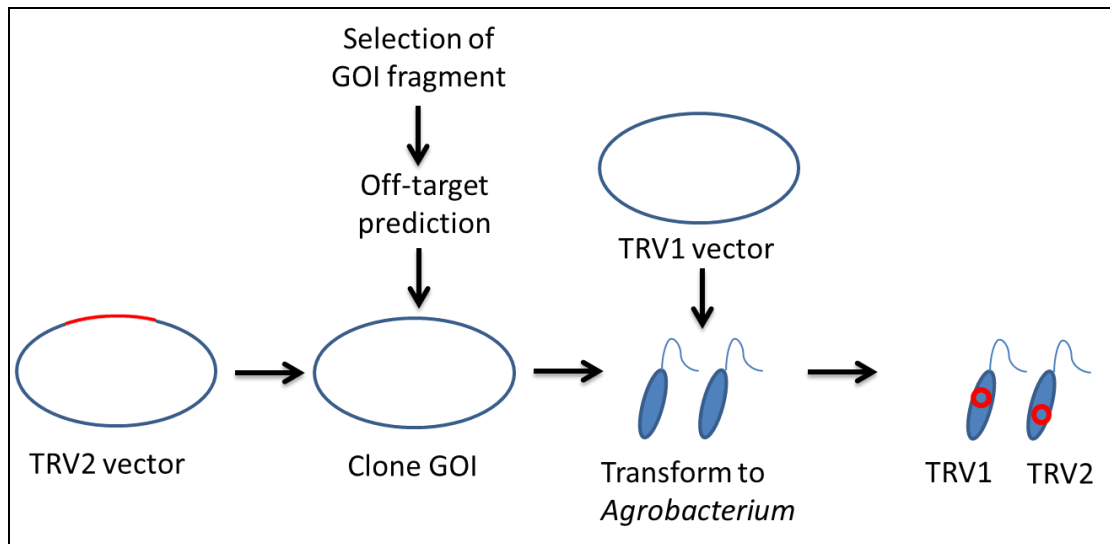
成 *LhPRS-CymMV* 構築體；另外以引子對 *LhPRS-TRV-XI-F* 與 *LhPRS-TRV-BI-R* 放大 *LhPRS* 313 bp 片段，經限制酶 *XbaI* 與 *BamHI* 剪切後接入 pTRV2-MCS，完成 *LhPRS-TRV* 構築體。兩種構築體經過核酸定序確認序列後，將 *LhPRS-CymMV*、*LhPRS-TRV* 及 pTRV1 構築體分別轉形至農桿菌 EHA105。轉形成功的農桿菌經過培養與誘導，用於接種文心蘭花序正下方第一片葉子。TRV 系統需以帶有 pTRV1 及 *LhPRS-TRV* 之農桿菌同時感染葉片（圖四，Senthil-Kumar and Mysore, 2014）。接種葉片後一至兩個月觀察花朵性狀，拍照記錄。進行花被組織的採收，部位包括唇瓣、花瓣與花萼，抽取 RNA 以供後續分析。



圖二、pCymMV Gateway 載體示意圖 (Hsieh *et al.*, 2014)。



圖三、pTRV1 與 pTRV2-MCS 之載體結構圖。



圖四、TRV 系統之農桿菌製備。

伍、研究結果

一、自 NGS 資料庫中取得 *LhPRS* 基因序列資訊

分析文心蘭品系檸檬文心花瓣與唇瓣轉錄體之次世代高通量定序 (NGS) 資料庫，比較基因在唇瓣與花瓣的表現差異，篩選唇瓣 FPKM 值大於 100，於唇瓣與花瓣之基因表現量有顯著差異者，得出一 *PRESSED FLOWER (PRS)* 同源基因(表一，粉紅色欄位)，命名為 *LhPRS*。

表一、於檸檬文心花瓣與唇瓣轉錄體中具差異性表現之候選基因

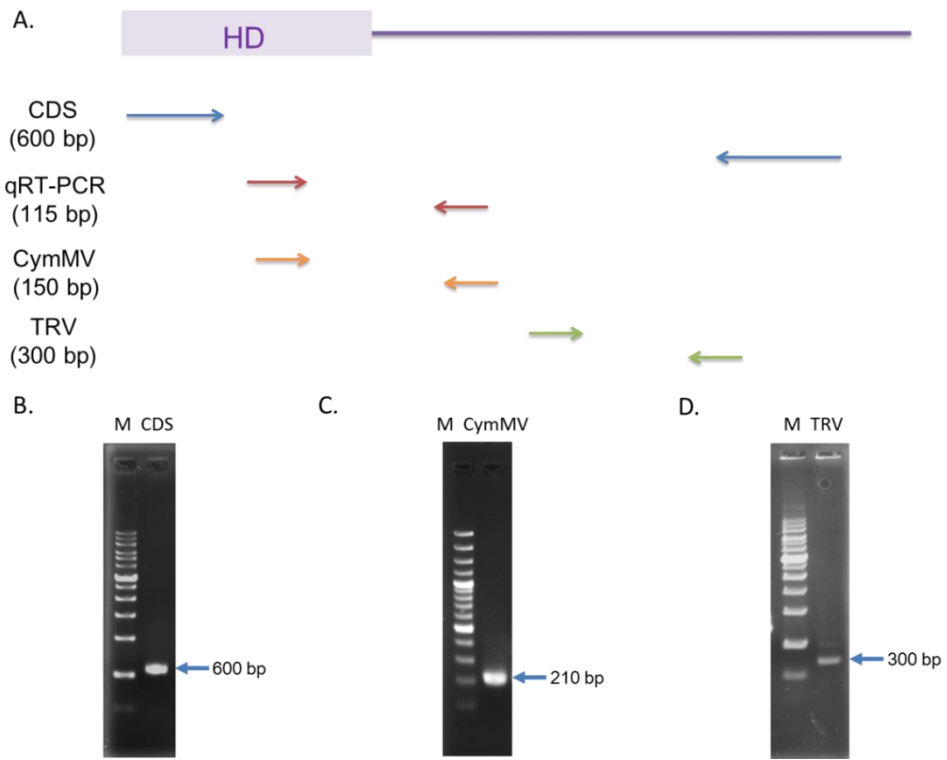
gene id	FPKM		Ratio & Log2 Ratio		strand	Annotation 1st_query_description
	LH-Lip_value	LH-P_value	Ratio (LH-Lip/LH-P)	Log2ratio (LH-Lip/LH-P)		
denovo.id15232.t r60488	187.014	3.14884	0.016837456	5.892182013	+	MADS box transcription factor 1 [Oncidium hybrid cultivar]
denovo.id21745.t r7958	104.927	613.645	5.848304059	-2.54801832	+	chloroplast ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit [Musa acuminata AAA Group]
denovo.id22842.t r71089	107.014	386.229	3.609144598	-1.851656945	+	hypothetical protein POPTRDRAFT_831063 [Populus trichocarpa]
denovo.id23054.t r4894	181.595	827.286	4.555665079	-2.187661688	+	carbohydrate-binding module family 13 protein [Ceriporiopsis subvermispora B]
denovo.id25468.t r158835	237.164	63.9398	0.269601626	1.891098898	+	PREDICTED: uncharacterized protein LOC100267455 [Vitis vinifera]
denovo.id28472.t r78242	527.167	156.917	0.297660893	1.748258403	+	histone H2B [Arabidopsis thaliana]
denovo.id32771.t r161888	126.838	35.4383	0.27939813	1.839605731	+	Early nodulin-like protein 15, putative [Theobroma cacao]
denovo.id33469.t r404951	130.412	9.59068	0.073541392	3.765299708	+	PRESSED FLOWER a [Juncus wallichianus]
denovo.id40517.t r9686	139.507	33.0133	0.236642606	2.079218251	+	histone H3.2 [Zea mays]
denovo.id41385.t r109703	340.332	99.9299	0.293624755	1.767954492	-	hypothetical protein CARUB_y10025540mg [Capsella rubella]
denovo.id45588.t r123255	169.191	645.658	3.816148613	-1.932117356	-	hypothetical protein TSTA_040370 [Talaromyces stipitatus ATCC 10500]
denovo.id51057.t r12932	106.442	29.1182	0.273559309	1.870074443	+	PREDICTED: actin-1-like isoform X1 [Setaria italica]
denovo.id57624.t r386600	165.87	605.35	3.649544824	-1.867716541	+	RecName: Full=Metallothionein-like protein type 3; Short=MT-3; AltName: Full=MWMT3
denovo.id8362.tr r25781	109.97	30.0177	0.272962626	1.873224663	+	candidate developmental transcription factor TCP1 [Phalaenopsis hybrid cultivar]

二、*LhPRS* 基因的選殖

自唇瓣的 cDNA 選殖出 *LhPRS* 基因包含完整編碼區序列的片段，包含 606 個鹼基對，可轉譯出 201 個胺基酸。藍色部分為 HOMEODOMAIN，紅色部分為 WUSCHEL box（圖五、圖六 A、圖六 B）。依據 *LhPRS* DNA 序列，設計 qRT-PCR 實驗所需之引子對，可增幅得到 115 bps（圖六 A）。針對 CymMV 系統與 TRV 系統 VIGS 實驗所使用的引子對，可分別可增幅得到 210 bps 與 300 bps（圖六 A、圖六 C、圖六 D）。

		HOMEODOMAIN															
1	ATG CCT CAA GTT CCA TCA ACA	AGA TGG TGC CCT ACA CCG GAG CAA	45														
1	Met Pro Gln Val Pro Ser Thr	Arg Trp Cys Pro Thr Pro Glu Gln	15														
46	CTT ATG ATA CTT GAA GAG ATG TAT	AGG AGT GGA GTG AGG ACT CCA	90														
16	Leu Met Ile Leu Glu Glu Met Tyr	Arg Ser Gly Val Arg Thr Pro	30														
91	AAT GCA TCT CAG ATT CAA CAG ATT	ACA TCA CAC TTG GGT TTG TAT	135														
31	Asn Ala Ser Gln Ile Gln Gln Ile Thr	Ser His Leu Gly Leu Tyr	45														
136	GGG AAG ATA GAG GGG AAA AAT GTG	TTC TAT TGG TTT CAA AAT CAT	180														
46	Gly Lys Ile Glu Gly Lys Asn Val Phe	Tyr Trp Phe Gln Asn His	60														
181	AAG GCA AGA GAT AGG CAG AAG CTT	AGG AGG AGA CTT AAT AGG CAA	225														
61	Lys Ala Arg Asp Arg Gln Lys Leu	Arg Arg Arg Leu Asn Arg Gln	75														
226	CAA ATG CAA GTT GCT TCG GTT AAT	TCT TCT TTT GTT AAT AAT TAT	270														
76	Gln Met Gln Val Ala Ser Val Asn Ser	Ser Phe Val Asn Asn Tyr	90														
271	CCA CTT CCA ACT CCT CCT CCT CAC	TTC TTT TCT CAT CTT TAT CAT	315														
91	Pro Leu Pro Thr Pro Pro Pro His Phe	Phe Ser His Leu Tyr His	105														
316	CAG TTT AGT CCT CAG TTT CTC CAC	CAG GGT GGA GGG TTT CAA GAG	360														
106	Gln Phe Ser Pro Gln Phe Leu His Gln	Gly Gly Gly Phe Gln Glu	120														
361	CCA AGA CAA GGA TTG GAT CTG CTT	CAA AAA CTA GAG ACC AAC GGT	405														
121	Pro Arg Gln Gly Leu Asp Leu Leu Gln	Lys Leu Glu Thr Asn Gly	135														
406	CGA GAC GAG GCT TCG CCG AGC GGC	ACA TCA TCG TGG CCG TAT GGC	450														
136	Arg Asp Glu Ala Ser Pro Ser Gly Thr	Ser Ser Trp Pro Tyr Gly	150														
451	TGC GAA TGG ACG GCT ACG ATT AAT	ACC GAG TCG AAC TCG GGC GAG	495														
151	Cys Glu Trp Thr Ala Thr Ile Asn Thr	Glu Ser Asn Ser Gly Glu	165														
496	TCA AGG TGT TGT CAC TCA CTT	CAA ACA TTG GAA TTG TTC CCA ACT	540														
166	Ser Arg Cys Cys His Ser Leu	Gln Thr Leu Glu Leu Phe Pro Thr	180	WUSCHEL box													
541	AAG AGC ACT GGT CTC AAG GAA GAA	AGT AGC ACC TCT AAG TCC TCA	585														
181	Lys Ser Thr Gly Leu Lys Glu Glu Ser	Ser Ser Thr Ser Lys Ser Ser	195														
586	TGC TCA GCT TCC ACC AAC TAA	606															
196	Cys Ser Ala Ser Thr Asn End																

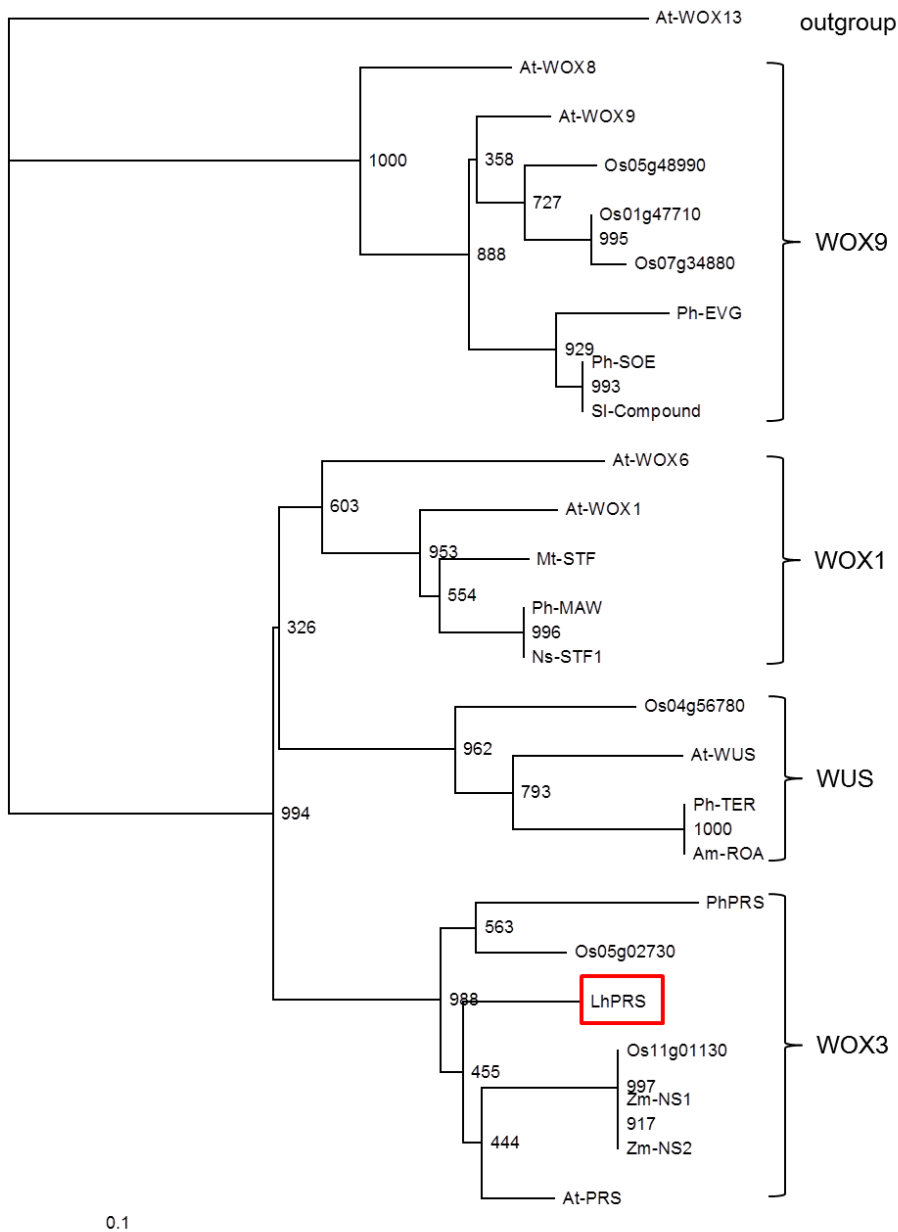
圖五、*LhPRS* 基因與胺基酸序列。



圖六、*LhPRS* 專一性引子相對位置圖與電泳結果。

三、*LhPRS* 演化樹分析

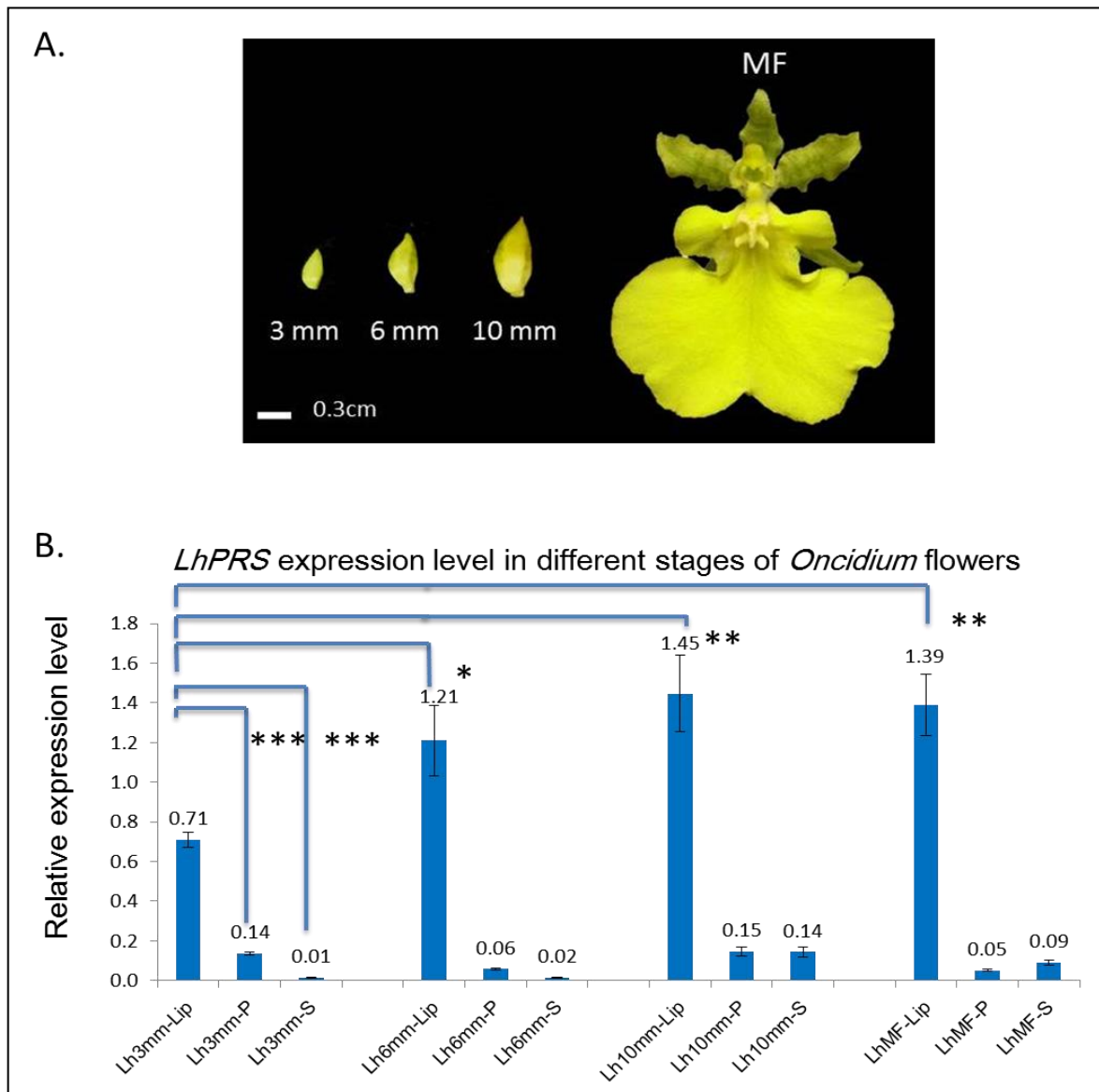
自 NCBI 資料庫下載各植物物種之 WOX 胺基酸序列，包括 *Arabidopsis thaliana* (At)、*Populus trichocarpa* (Pt)、*Oryza sativa* (Os)、*Petunia×hybrida* (Ph)、*Zea mays* (Zm)、*Nicotiana sylvestris* (Ns)、*Medicago truncatula* (Mt)、*Antirrhinum majus* (Am)、*Solanum lycopersicum* (SI)、*Oncidium Lemon Heart* (Lh)。截取各蛋白質的 HD domain (約 63 個胺基酸序列)，以 Neighbor-Joining (NJ) 方法進行演化樹分析。由演化樹得知 *LhPRS* 歸類於 WOX3 族群，與 NS1、NS2、*At-PRS* 十分相近 (圖七)。



圖七、WOX 蛋白質群演化樹分析圖。

四、分析 *LhPRS* 於不同時期中花被各部位的基因表現量

收取文心蘭花苞長度為 3 毫米、6 毫米、10 毫米與成熟花之花被各部位（圖八 A），進行 *LhPRS* 基因表現量偵測。由（圖八 B）中可明顯看出，*LhPRS* 基因於各時期之唇瓣表現量都高出花瓣與花萼許多，其中又以成熟花時期的唇瓣對花瓣基因表現量之比值為最大，3 毫米花苞時期比值最小，可見 *LhPRS* 基因於早期表現量較低，隨著花朵成熟，表現量隨之提升。另外可發現 *LhPRS* 基因在花瓣與花萼表現量變化的趨勢，原先花瓣的 *LhPRS* 基因表現量高於花萼，隨著花朵逐漸成熟，*LhPRS* 基因於花萼中的表現量漸漸超越花瓣。



圖八、文心蘭 *LhPRS* 於不同時期花被各部位之基因表現量分析。數值為實驗三重複之平均值，

*表示 $p < 0.05$ ；**表示 $p < 0.01$ ；***表示 $p < 0.001$ 。

五、*LhPRS*-CymMV 基因靜默文心蘭之花朵與基因表現量分析

利用 CymMV-VIGS 系統對 *LhPRS* 進行基因靜默實驗，控制組施打 5 盆，實驗組施打 9 盆，欲藉由基因靜默使文心蘭性狀出現變化。開花後觀察性狀，有部分實驗組花朵形態產生變異，收取實驗組 Cym1 與控制組 LhCym2f1~4 之花被組織進行分析。

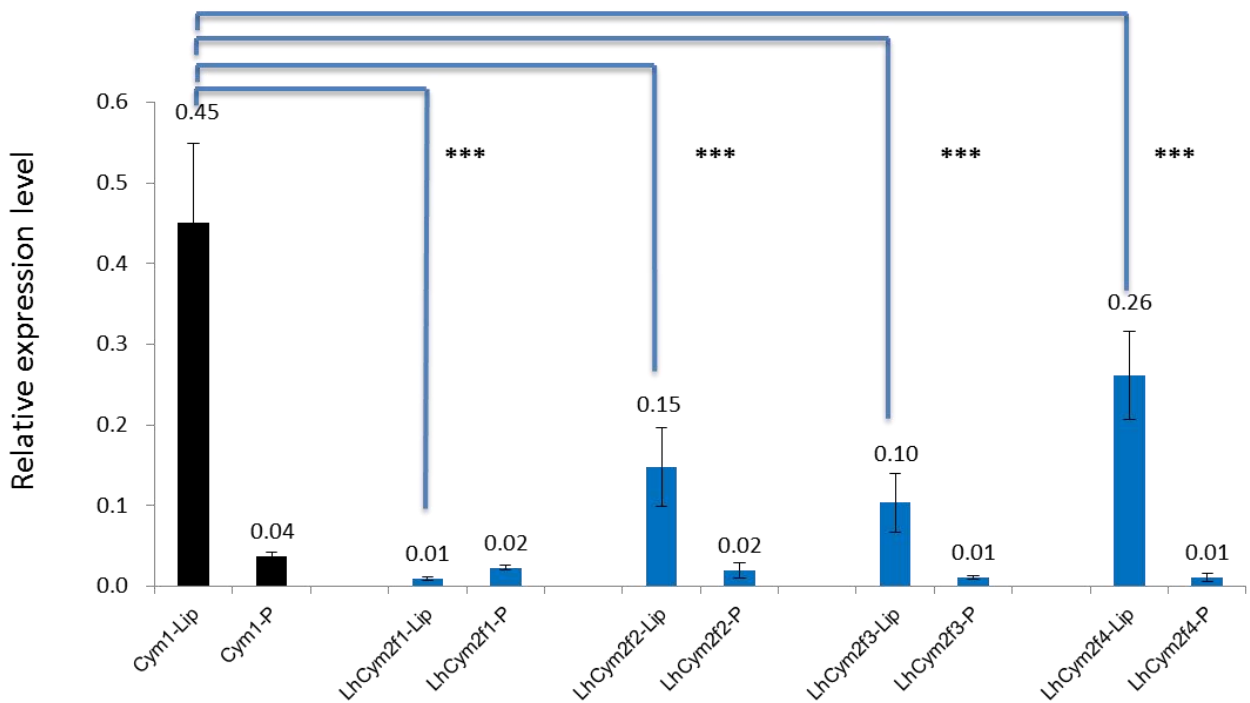
自（圖九 A）可觀察到，控制組 Cym1 花型與野生型無異，花瓣花萼成五叉狀展開，唇瓣裙裾形狀完整。實驗組 LhCym2f1 的花型明顯小於野生型花朵，唇瓣嚴重扭曲且失去對稱性，裙裾邊緣破碎，花萼與花瓣均嚴重萎縮。實驗組 LhCym2f2 的花瓣與花萼的形狀均無太大變化，但是生長位置明顯偏移中軸。實驗組 LhCym2f3 的花瓣花萼有些微捲曲，生長位置明顯偏離中軸。實驗組 LhCym2f4 的唇瓣中軸嚴重偏移，裙裾邊緣有多處明顯向內凹陷的部分，深度甚至超過中央凹陷；下方兩片側花萼嚴重歪斜，花瓣與背花萼的生長位置偏離中軸。

（圖九 B）中，黑色長條為控制組 Cym1，藍色長條為實驗組，實驗組相較於控制組在唇瓣的 *LhPRS* 表現量均有明顯下降，且可由各組唇瓣 *LhPRS* 表現量的下降程度驗證基因靜默的效果。其中以 LhCym2f1 組的基因靜默的效果最好，*LhPRS* 表現量下降最為顯著 (0.01)，產生唇瓣變異的性狀最為嚴重；LhCym2f2~4 組的 *LhPRS* 表現量下降較少 (0.15, 0.10, 0.26)，靜默效率較低，唇瓣產生變異的性狀較不明顯，但可從花萼花瓣的相對位置觀察到花朵對稱軸產生扭曲的性狀。

A. Flowers of *LhPRS-CymMV-VIGS Oncidium*



B. *LhPRS* expression level in *CymMV-VIGS Oncidium*



圖九、文心蘭 *LhPRS-CymMV-VIGS* 植株基因表現量分析。數值為實驗三重複之平均值，

*表示 $p < 0.05$ ；**表示 $p < 0.01$ ；***表示 $p < 0.001$ 。

六、*LhPRS*-TRV 基因靜默文心蘭之花朵與基因表現量分析

利用 TRV-VIGS 系統對 *LhPRS* 進行基因靜默實驗，控制組施打 3 盆，實驗組施打 5 盆。開花後觀察性狀，有 2 盆植株的花朵形態有明顯變化，收取該兩組實驗組與控制組的花被組織進行分析。

由(圖十 A)可以觀察到，控制組 TRV2 花型與野生型無異，花瓣花萼成五叉狀展開，唇瓣裙裾形狀完整。實驗組 LhTRV2f1 唇瓣底部中央失去原本內凹的邊緣線條，面積較 TRV2 縮小；花瓣末端出現三角形缺口，形成明顯的主脈。實驗組 LhTRV2f2 的花型與正常文心蘭花朵相似，邊緣出現皺褶與細小缺損，唇瓣左右對稱但花萼的生長位置偏離中軸。實驗組 LhTRV5f1 的唇瓣面積與 TRV2 相比明顯較小，唇瓣形狀產生變異，花瓣與花萼則無明顯性狀。實驗組 LhTRV5f2 的唇瓣面積變小，側花萼生長位置偏離中軸。

如(圖十 B)所示，黑色長條為控制組 TRV2，與 TRV2 相較之下，每個實驗組 (LhTRV2f1, LhTRV2f2, LhTRV5f1, LhTRV5f2) 的唇瓣中的 *LhPRS* 表現量均明顯下降 (37.92 vs. 8.85, 32.70, 17.39, 9.95)且可由各組唇瓣的 *LhPRS* 表現量的下降程度驗證基因靜默的效果，其中以 LhTRV2f1 組的效果為最佳 (8.85)，花朵產生的形態變異最大；而 LhTRV2f2 組的靜默效率最低 (32.70)，形態與控制組最相近。

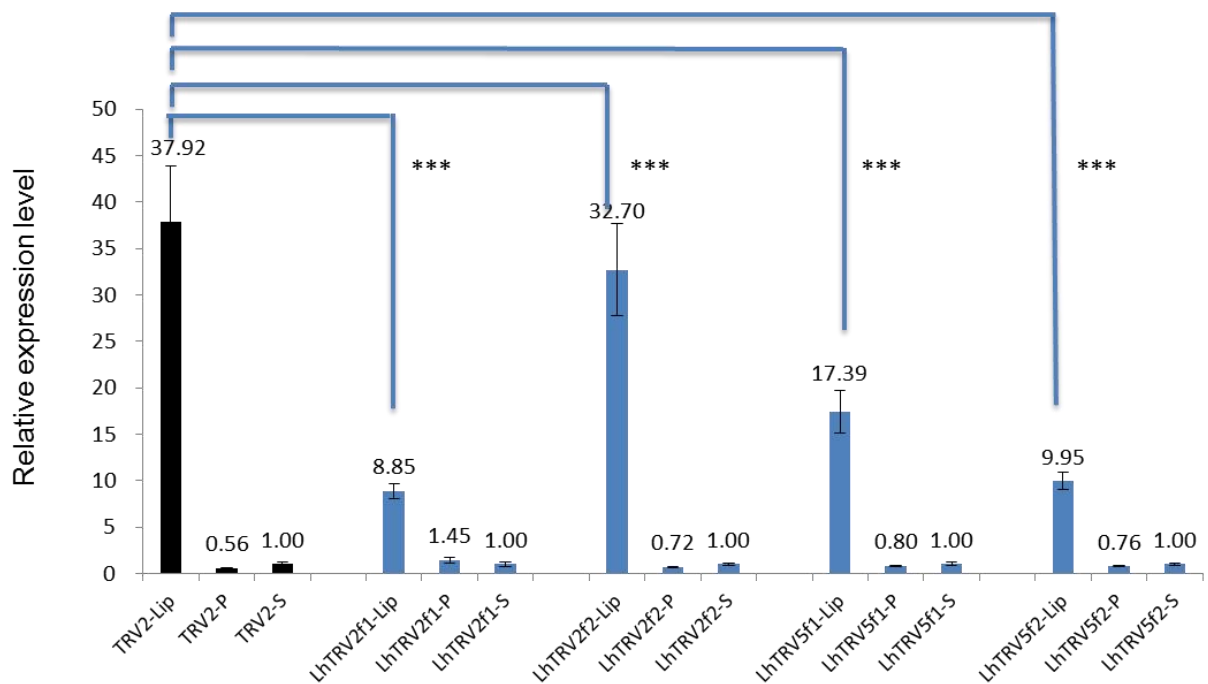
A.

Flowers of *LhPRS-TRV-VIGS Oncidium*



B.

LhPRS expression level in TRV-VIGS *Oncidium*



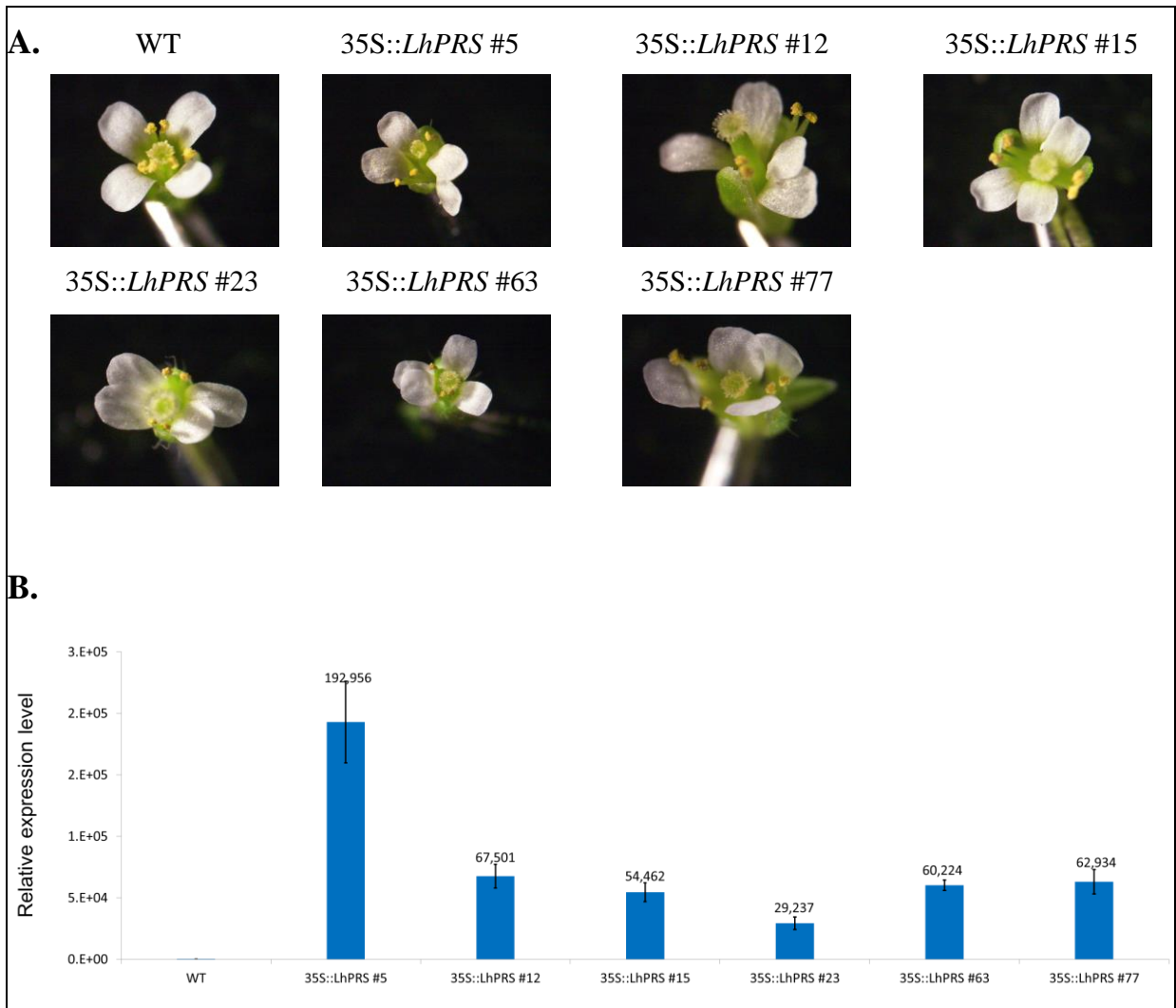
圖十、文心蘭 *LhPRS-TRV-VIGS* 植株基因表現量分析。數值為實驗三重複之平均值，*表示 $p < 0.05$ ；**表示 $p < 0.01$ ；***表示 $p < 0.001$ 。

七、大量表現 *LhPRS* 基因的阿拉伯芥植株之花朵與基因表現量分析

大量表現 *LhPRS* 基因使部分轉殖株花朵形態有明顯變化，收取 35S::*LhPRS* 轉殖株與野生型阿拉伯芥的葉片組織進行基因表現分析。

由（圖十一 A）可觀察到，野生型（WT）花朵有四片花瓣，呈輻射對稱，雄蕊排列整齊。35S::*LhPRS* #5 花朵生長面呈直角扭曲，雄蕊生長方向不一；35S::*LhPRS* #12 花朵呈現極度不對稱，有花瓣重疊與分布不均的現象，雄蕊歪斜；35S::*LhPRS* #15 花瓣呈蝶形分布，雄蕊水平向外生長；35S::*LhPRS* #23 花瓣重疊，其中一片生長方向歪斜；35S::*LhPRS* #63 花瓣重疊，花型不對稱；35S::*LhPRS* #77 花瓣部分重疊，生長方向歪斜嚴重。

由（圖十一 B）所示，黑色長條為控制組 WT，其中以 35S::*LhPRS* #5 組的 *LhPRS* 表現量最高。



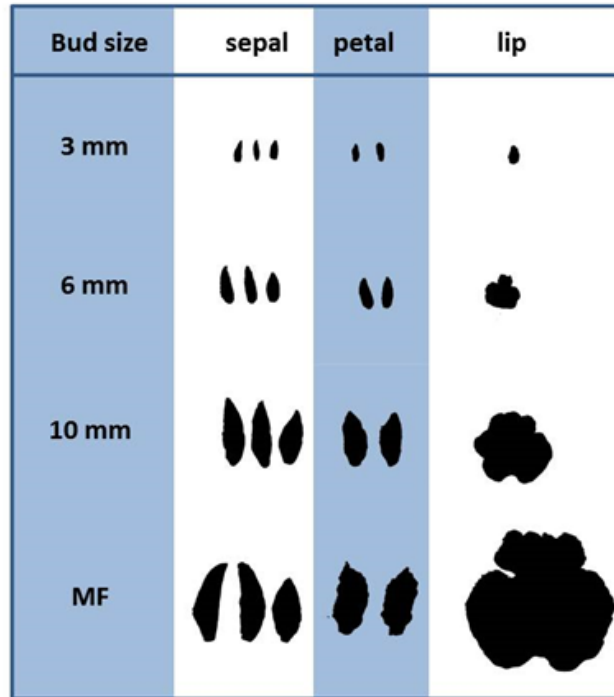
圖十一、35S::LhPRS 之阿拉伯芥植株基因表現量分析。

陸、討論

一、*LhPRS* 基因表現量與各時期花被形態分化的關聯性

Transcriptome profiles of *Oncidium* perianths

Onc. Lemon Heart



圖十二、文心蘭花朵各時期花被組織大小示意圖。

(圖十二) 為文心蘭各時期花被組織的相對面積，每列由左至右分別為花萼 (sepal)、花瓣 (petal) 與唇瓣 (lip)。於 3 毫米花苞時期，唇瓣的面積與花瓣、花萼相差無幾，但從 6 毫米花苞時期開始唇瓣面積急遽增加，到達成熟花時期 (MF) 唇瓣的大小約是花萼、花瓣的 5-10 倍大；同時，由 (圖八) 數據顯示，*LhPRS* 基因表現量自 6 毫米花苞時期過後明顯上升，於成熟花時達到最高表現量，與唇瓣面積最大的時期一致。先前也有研究指出 *PRS* 基因具有促進細胞增生的功能，會造成阿拉伯芥表皮細胞增生並產生細小突起 (Matsumoto and Okada, 2001)，因此我們推論唇瓣的大小與 *LhPRS* 基因表現量多寡有密切相關，藉由 *LhPRS* 調控細胞數目進而影響唇瓣的面積大小。

二、*LhPRS* 基因靜默對於文心蘭花朵對稱性的影響

唇瓣的對稱性

由實驗組 *LhCym2f1* 可發現經過 *CymMV-VIGS* 靜默後，唇瓣形狀明顯扭曲，失去中央對稱性，為基因靜默效率最高的組別，*LhPRS* 基因於唇瓣表現量被壓低近 45 倍（圖九）；實驗組 *LhCym2f4* 的唇瓣發育明顯偏離中軸，出現左側大於右側的形態；實驗組 *LhTRV2f1* 的唇瓣失去原本底部中央內凹的邊緣線條，而無法呈現原本完整的兩側對稱，該組 *LhPRS* 基因表現量被壓低近 5 倍。我們推測 *LhPRS* 基因表現量的大量下降會使唇瓣的對稱軸偏移，進而導致唇瓣失去對稱性。

花瓣與花萼的對稱性

在 *CymMV-VIGS* 系統中，*LhPRS* 的表現量於花瓣、花萼中皆被壓低 2-4 倍，可明顯觀察到對稱性的改變，原本應呈五芒狀向外開展的三片花萼和兩片花瓣出現捲曲、歪斜等現象。實驗組中以 *LhCym2f1* 的對稱性最差，花萼與花瓣無法完全展開，且形狀不完整；至於 *LhCym2f2*、*LhCym2f3* 與 *LhCym2f4* 則是背花萼明顯向左方偏離。雖然 *LhPRS* 基因於花瓣與花萼中表現量一直十分低，不過在經過 *CymMV-VIGS* 進行基因靜默後，靜默程度不高的組別仍然與控制組相較有顯著差異，顯示低程度的表現量下降即能造成明顯性狀改變，因此我們推測 *LhPRS* 基因靜默對花瓣花萼的對稱性有重要影響，表現量下降時會出現生長對稱軸偏移的現象。

三、*LhPRS* 基因靜默對於文心蘭花被形態完整性的影響

唇瓣的完整性

實驗組 *LhCym2f1* 的唇瓣有多處缺陷且面積縮小許多，同時基因靜默程度為最高，其他實驗組靜默程度不一，於各自的唇瓣均有輕微缺陷，但遠不如 *LhCym2f1* 來的明顯。我們推論 *LhPRS* 基因對於唇瓣的完整性有影響，不過需要基因表現量下降到一定程度（如 40~50 倍）才會有明顯的性狀，若下降程度只有 2~5 倍，只能造成唇瓣裙裾輕微缺損。

花瓣與花萼的完整性

經由 TRV-VIGS 系統進行基因靜默的實驗組 LhTRV2f1 中，花瓣末端出現明顯三角形缺口，推測可能是由於在花萼壓的表現量較多而使花瓣與花萼表現量比值翻轉所造成，進而推論 *LhPRS* 有在各花器必須維持恆定比例以發育成特定花型之可能性。此推測需要更多類似的結果出現與進一步實驗證明。

四、大量表現 *LhPRS* 基因於阿拉伯芥植株對花型的影響

由（圖十一）當中可觀察到 WT 的花型十分對稱，但當 *LhPRS* 基因被大量表現的時候，於各組中出現了花型失去對稱、生長歪斜等情況，以 35S::*LhPRS* #5 最為嚴重，花朵生長面垂直扭曲，35S::*LhPRS* #12 與 35S::*LhPRS* #77 的花瓣重疊且生長方向雜亂。綜合先前文獻與本實驗提出兩種推測：(1) 由於阿拉伯芥的 *At-PRS* 與文心蘭 *LhPRS* 蛋白質的 Homeobox domain 十分相似，但 C 端序列差異性很大，因此當 *LhPRS* 基因於植株內大量表現時，可能會影響 *At-PRS* 內生性功能，產生類似 Dominant-negative effect，干擾 *At-PRS* 基因使其無法正常執行調控對稱性之功能，最終使花朵失去對稱性。(2) 由於 *LhPRS* 基因序列並非完全與 *At-PRS* 相同，因此也有可能是 *LhPRS* 被辨認為其他具有相似 Homeobox domain 的基因，放大該基因表現量而干擾 *At-PRS* 的功能，此推測可經由檢測組織中其他相近基因群(如 *WOX1*、*WUS* 基因群)的表現量來驗證。

五、CymMV-VIGS 與 TRV-VIGS 系統對於文心蘭基因靜默的效果

本研究使用病毒誘導基因靜默技術，選用 CymMV-VIGS 系統與 TRV-VIGS 系統，依據實驗結果推測此兩種系統對於文心蘭 *LhPRS* 之基因靜默皆有效果，性狀在農桿菌接種 1 至 2 個月後產生，也驗證了 VIGS 系統的效力；部分實驗組的花朵基因靜默效果不明顯，而呈現出正常花型，推測原因為 VIGS 對於目標基因的抑制效率存在個體差異。

柒、結論

一、*LhPRS* 基因於唇瓣與花瓣中的表現量相差懸殊，於成熟花時期參與唇瓣與花瓣分化調控的程度最高。唇瓣的大小與 *LhPRS* 基因表現量多寡有密切相關。

二、*LhPRS* 基因靜默後會使唇瓣面積縮小、裙裾線條變形而失去對稱性，或使花瓣與花萼的生長偏離對稱軸。

三、*LhPRS* 基因表現量之下降程度會影響花型改變的程度，靜默程度需壓低 40-50 倍，整朵花的花型才會明顯扭曲；反之只能輕微影響唇瓣、花瓣及花萼的對稱性與面積大小。

四、於阿拉伯芥中大量表現 *LhPRS* 基因會造成花型明顯失去對稱，甚至使生長面扭曲。

捌、未來展望與應用

將 *LhPRS* 基因應用於蘭花的花型改造是一項具有發展潛力的研究，若要建立最佳的模式系統，應先於文心蘭各品系中篩選以找出最適合 CymMV-VIGS 系統與 TRV-VIGS 系統的文心蘭品系，提高 *LhPRS* 基因受到靜默的效率，以求更明顯的性狀變化，而後將發展出的基因研究模式系統運用於其他蘭花品系的 *PRS* 基因選殖，發展更大範圍的用途；亦可考慮是否有其他基因共同參與蘭花花型對稱性的調控，藉由該模式系統進行功能性比較與分析。

單子葉植物與雙子葉植物中的 *PRS* 同源基因功能不盡相同，然而目前只於阿拉伯芥中有較為透徹的研究，期望日後能夠選殖出不同種蘭花之 *PRS* 同源基因，釐清各種蘭花 *PRS* 基因參與調控的作用。利用操作與花朵發育相關的 *PRS* 基因，改變花被的形態以提供多樣化的花型，提升蘭花的經濟價值。

玖、參考文獻

張允瓊、李晔，2000。文心蘭‘Gower Ramsey’假球莖與花序之生長、型態與解剖。中國園藝。
45：87-99.

Blázquez M. 2000. Flower development pathways. *J Cell Sci.* **20**: 3547-3548.

Coen ES. and Meyerowitz EM. 1991. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* **353**: 31-37.

Costanzo E., Trehin C. and Vandenbussche M. 2014. The role of WOX genes in flower development. *Annals of Botany* **7**: 1545-1553.

Cozzolino S. and Widmer A. 2005. Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? *Trends EcolEvol.* **9**: 487-494.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**: 95-98.

Hsieh M., Pan Z., Yeh H. and Chen H. 2014. Virus-induced Gene Silencing (VIGS) in Phalaenopsis Orchids. *Bio-protocol* **24**: e1359. doi: 10.21769/BioProtoc.1359.

Krizek BA. and Fletcher JC. 2005. Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide. *Nat Rev Genet* **9**: 688-698.

Laux T., Mayer KF., Berger J. and Jürgens G. 1996. The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in Arabidopsis. *Development* **1**: 87-96.

- Matsumoto N. and Okada K. 2001. A homeobox gene, *PRESSED FLOWER*, regulates lateral axis-dependent development of Arabidopsis flowers. *GENES & DEVELOPMENT* **24**:3355-3364.
- Nardmann J., Ji J., Werr W. and Scanlon MJ. 2004. The maize duplicate genes *narrow sheath1* and *narrow sheath2* encode a conserved homeobox gene function in a lateral domain of shoot apical meristems. *Development* **12**: 2827-2839.
- Senthil-Kumar M. and Mysore KS. 2014. Tobacco rattle virus-based virus-induced gene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Nat Protoc.* **9**: 1549-1562.
- Su CL., Chen WC., Lee AY., Chen CY., Chang YC., Chao YT. and Shih MC. 2013. A Modified ABCDE Model of Flowering in Orchids Based on Gene Expression Profiling Studies of the Moth Orchid *Phalaenopsis aphrodite*. *PLoS One* **8**: e80462. doi: 10.1371/journal.pone.0080462.
- Sun W., Xu Y., Xu GY., Sun PG., Song S. and Chang SH. 2014. Virus-induced Gene Silencing and Its Application in Plant Research. *BIOTECHNOLOGY BULLETIN* **10**:105-110.
- Wolberger C. 1996. Homeodomain interactions. *Curr Opin Struct Biol.* **1**: 62-68.
- Yoshikawa T., Tanaka SY., Masumoto Y., Nobori N., Ishii H., Hibara K., Itoh J., Tanisaka T. and Taketa S. 2016. Barley NARROW LEAFED DWARF1 encoding a WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 3 (WOX3) regulates the marginal development of lateral organs. *Breeding Science* **66**: 416–424.

附錄: 所使用的引子與其序列

引子名稱	序列 (5'→3')
OnPRS-ATG-F	GTGAAATGCCTCAAGTTCCATCAACAA
OnPRS-TAA-R	TTATGTGGTAGCTGAGCATGAGG
<i>LhPRS</i> -RT-F	TCATAAGGCAAGAGATAGG
<i>LhPRS</i> -RT-R	GGAGTTGGAAGTGGATAA
<i>LhPRS</i> -Cym-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAA AAGCA GGCTCAAAGA TGGTGCCCTACACCGGAGCA ACT
<i>LhPRS</i> -Cym-R	GGGGACCACTTTGTACAAGA AAGCTGGGTCAACCA ATAGAACACATTTTTCCCCTCT
<i>LhPRS</i> -TRV-XI-F	CCTCT AGAGCAAGTTGCTTCGGTTATTCT
<i>LhPRS</i> -TRV-BI-R	CCGGA TCCTCTTAGTTGGGAACAATTC
OnAT-RT-3	GGATTAGGCTCTCTGCTGTTGG
OnAT-RT-4	GTGTGGATAAGACGCTGTTGTATG
<i>LhPRS</i> -BI-ATG-F	CCGGA TCCAT GCCTC AAGTT CCATC AAC
<i>LhPRS</i> -Sal-TAA-R	CCGTC GACTT AGTTG GTGGA AGCTG AGC

註：黃標字體為限制酶辨識切位。

【評語】 060013

找到一個改變文心蘭花型的新基因，有趣且應用潛力的研究，
有很好的研究成果，唯學生對相關的背景知識可再稍作加強。