



國立臺灣大學生物資源暨農學院園藝暨景觀學系

碩士論文

Department of Horticulture and Landscape Architecture

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

大白花蝴蝶蘭‘V3’於養分逆境下的生理反應

及缺磷下的基因表現

Physiological Responses under Nutrient Stresses  
and Gene Expression under Phosphorus Deficiency in  
*Phalaenopsis* Sogo Yukidian ‘V3’

羅妙禎

Miao-Zhen Luo

指導教授：張耀乾 博士、邱子珍 博士

Advisors: Dr. Yao-Chien Alex Chang and Dr. Tzyy-Jen Chiou

中華民國一〇三年十二月

December , 2014



## 致謝

本論文承蒙恩師 張耀乾教授與邱子珍教授在妙禎的求學過程中，給予細心、用心、耐心的指導而得以完成。感謝張耀乾老師給予學生溫暖的鼓勵與支持，謝謝您總是相信我，讓我無後顧之憂地進行試驗，在學生感到徬徨之時指引方向。感謝邱子珍老師博我以文，約我以禮，給予我最大的包容與提攜，教導我關於學術研究該具備的知識與態度，讓我在中研院擁有最好的資源與環境學習，不辭辛勞地在過程中陪我討論並給予鼓勵，這段經歷對學生而言無比珍貴。感謝陳香君老師教導我對於植物解剖的知識與技術，並且在實驗與論文上給予諸多專業的指導與提醒，學生受益良多。感謝林淑怡老師在試驗過程及論文上給予學生許多寶貴的建議與鼓勵。特別感謝張正老師帶領學生進入學術研究的領域，是我在大學期間探索新知時重要的啟蒙老師。老師們的諄諄教誨，學生感激不盡、銘記在心。

感謝中研院農生中心與邱子珍老師實驗室的所有學長姐，謝謝素芬、慶美、佳玲、右瑩、玫蓓、凱渝、毓婷、靜儀、昀皓、晏宇等助理們在這兩年半以來的各種指導與協助，教我分生技術上的知識、帶著我做實驗、協助我的各種困難與疑惑；感謝維怡、姿吟、登魁、淑怡、惠芬、尚捷等博後與博班學長姊，你們對於生命科學研究的認真與熱忱一直是我敬佩的榜樣，更感謝您們在這一路上給予的建議與鼓勵。感謝黃姐的貼心與熱情無所不在。對實驗室大家的感激之情溢於言表，因為有你們，我才得以完成論文，我所學的、所會的都來自於這個團結且對研究充滿熱情與執著的實驗室，我是多麼幸福可以擁有這段人生旅程。特別感謝蘇春霖博士引領我踏入蝴蝶蘭基因體的研究領域，並總是在關鍵時刻提出盲點，耳提面命地教導我做研究的精神與態度。感謝趙雅婷博士、Sandy、存儀及美倫在蝴蝶蘭基因體研究過程中的細心協助。感謝振權學長教授蘭花組織新鮮切片的技術。感謝基因體中心孫秀珍小姐在人候室栽種蝴蝶蘭期間細心的照料。感謝南部中研院辜瑞雪老師實驗室在蝴蝶蘭RNA原位雜交試驗上專業的技術與幫忙。

花卉館有如我在台北第二個家。感謝李晔老師、張育森與葉德銘老師提供充足的資源與良好的環境，使花卉館總是無時無刻充滿溫暖與歡笑。感謝實驗室婉怡、雋言、丁楨、雅琪、白暄、葉文、頌敏學長姐在整個過程中給予非常多的提點與鼓勵，因為你們的協助使此論文能更臻完整。感謝實驗室的夥伴宜君、怡臻、爾璇、季珈、沛延、乃潔、裕謙、詩穎、仁安一起互相陪伴與打氣而使這段回憶充滿溫馨。感謝任伯伯與花卉館每位天使級的學長姐，韶妤、小范、Pipi、蕙心、采依、明显、好泓、明治、倩瑩、小侯給予我各種幫助與溫暖的關心。感謝研究所最重要的夥伴們，大砲、小狗、涵茵、阿泰學長、嘉樺、憲哥與智超的陪伴，你們豐富了我的碩士生涯，永遠懷念我們一起吃飯、一起談笑的時光。感謝花卉館所有學弟妹的陪伴，難忘駿逸、嫻婷帶給我溫暖的關懷與建議。謝謝摯友美美、香誼、晔廷與宜柔總是在我無助時給予我微笑與力量。

最後，感謝我生命中最重要的人，謝謝我親愛的爸爸、媽媽、妹妹、弟弟，因為有你們對我滿滿的愛，當我最堅強的後盾，帶給我堅持到底的動力與勇氣，我才能順利地完成學業。感謝親愛的李盈歡，謝謝你一路走來，始終如一，無怨無悔，開心我的開心，難過我的難過，陪伴在我的身邊，和我一起完成。謹以此論文獻給我珍愛的家人與朋友。



## 摘要

蝴蝶蘭(*Phalaenopsis* spp.)為附生蘭，對營養逆境有極高的耐受度，缺肥徵狀不易顯現。為了瞭解蝴蝶蘭在養分缺乏下的生存機制，本論文分為三大部分，分別從生理、解剖與基因表現層面，探討必要大量元素氮、磷或鉀缺乏逆境對蝴蝶蘭的影響。

本研究給予大白花蝴蝶蘭 *Phal.* Sogo Yukidian ‘V3’ 中苗不同濃度的氮(0、0.71、7.14 mM)、磷(0、0.16、6.14 mM)、鉀(0、0.38、3.84 mM)肥料，調查蝴蝶蘭於缺乏養分逆境下的病徵與生長反應。蝴蝶蘭栽種於 30/25 °C 的人工氣候室，缺肥 4 週、8 週或 12 週的植株於外觀及生長量無差異。而植株栽種於高溫環境下維持營養生長且缺肥處理 32 週後，缺氮植株鮮重降低，葉面積及葉數減少；缺磷植株有落葉現象；缺鉀則沒有任何徵狀。移至 25/20 °C 的環境進行低溫催花的植株，缺肥處理 32 週後，缺氮植株有乾重降低、葉片變黃、抽梗提早現象，但花朵數減少、花徑變小且花梗縮短；缺磷植株抽梗率降低、落葉明顯且葉片呈紫色；缺鉀未影響植株外觀及生長量，僅造成抽梗延後。另外，於營養生長下缺氮 12 週即造成蝴蝶蘭光合作用效率下降，然而，即使缺鉀 32 週後，植株的光合作用能力仍不受影響；缺磷 32 週處理下雖不影響葉綠素螢光參數 Fv/Fm，但最大二氧化碳交換速率下降。

蝴蝶蘭 *Phal.* Sogo Yukidian ‘V3’ 的根部外層具有 2 層特化的根被組織，內皮層和外皮層則分別具有細胞壁呈現 O 型及 U 型加厚的長細胞，以及通過細胞座落其中，內皮層中的通過細胞位於木質部的相對處，這些構造可能有利於水分及養分的吸收及保留。磷為植物生長與繁衍所必須之元素，缺磷不會改變蝴蝶蘭根部與葉片的細胞形態，但缺磷造成蝴蝶蘭根部中柱變小、維管束數量減少。

自微矩陣分析中挑選 37 個於缺磷下明顯表現改變的基因，利用反轉錄聚合酶連鎖反應加以驗證，大部分葉片中的上調基因可以被驗證，但下調基因無法被確認。其中，PATC128122 蛋白質上具 RING 功能區塊，對於缺磷具專一性反應，並



顯著於缺磷 12 週後在蝴蝶蘭的葉片和根部內提高表現，原位雜交結果顯示其表現位置為根部的皮層細胞、葉片主脈的韌皮部。利用含兩倍花椰菜嵌紋病毒 35S 啟動子的載體大量表現 PATC128122 於阿拉伯芥內，發現 35S::PATC128122 轉植株栽種於不同磷濃度(250、50、10 mM Pi)的條件下，其轉植株的鮮重、無機磷濃度與外觀皆與野生型植株沒有差異。

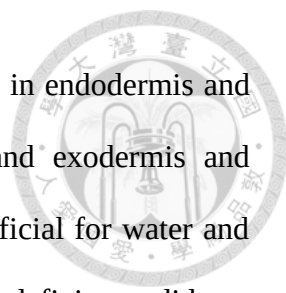
綜合上述結果顯示，蝴蝶蘭的缺肥徵狀於長期缺肥 32 週下顯現，又以開花植株最為嚴重。但於相對短期的缺磷逆境下，縱使植株外觀未見明顯變化，基因表現及維管束形態已產生差異，顯示蝴蝶蘭植株內部已啟動因應機制，未來將可再進一步探討蝴蝶蘭於缺肥下表現基因的功能。

## Abstract

*Phalaenopsis* spp., an epiphytic orchid, is tolerant to nutrient stresses. The nutrient deficient symptoms usually develop very slowly. To understand how *Phalaenopsis* survives under nutrient starvation, we examined the effect of nitrogen (N), phosphorus (P) or potassium (K) deficiency on *Phalaenopsis* from the aspects of physiology, anatomy, and gene expression, respectively.

To investigate the symptoms and growth responses of *Phalaenopsis* under nutrient deficiency, *Phal.* Sogo Yukidian ‘V3’ plants were supplied with fertilizer containing different concentrations of N (0, 0.71, 7.14 mM), P (0, 0.16, 6.14 mM), or K (0, 0.64, 6.4mM). Plants were grown in a 30/25 °C phytotron, and no significant differences in plant appearance and growth were observed during 4, 8, or 12 weeks of starvation. When plants were kept at vegetative growth and starved for 32 weeks, N deficiency resulted in reduced whole-plant fresh weight, total leaf area, and leaf number and P deficiency aggravated leaf falling. However, no effects were observed under K deficiency. The 8-week nutrient-starved plants were further subjected to low temperature (25/20 °C) to provoke flowering. At 32 weeks of nutrient deficiency, N deficient plants showed early spiking, reduced dry weight, and appearance of yellow leaves; P deficiency caused decreased spiking rate along with the increase of falling leaves and the development of purple pigment. However, the growth were not affected by K deficiency except for delayed spiking. Besides, photosynthesis efficiency decreased significantly after 12 weeks of N deficiency but was not affected by K deficiency even after 32 weeks of deficiency. While low-P treatment reduced the net carbon dioxide exchange rate, it did not affect chlorophyll fluorescence (Fv/Fm), suggesting photosystem II was not impaired.

There are two cell layers of velamen at the outermost of *Phal.* Sogo Yukidian ‘V3’



roots. There are long cells with O-shaped walls and U-shaped walls in endodermis and exodermis, respectively. Passage cells were among endodermis and exodermis and opposite to the xylem in endodermis. These structures may be beneficial for water and nutrient uptake and retention. Anatomical analyses revealed that P deficiency did not significantly affect cell morphology of roots and leaves but decreased the size of stele and the number of vascular bundle in roots.

Furthermore, several P starvation-responsive genes identified from a previous microarray analysis were selected for validation by reverse transcription polymerase chain reaction analysis. I was able to validate the up-regulated expression for most of genes in leaf but unable to confirm the down-regulated expression of several genes. Among them, the expression of PATC128122, encoding a RING domain-containing protein, was highly up-regulated in the leaves and roots subjected to 12-week P deficient treatment but didn't respond to N or K deficient treatment. Results of in situ RNA hybridization indicated its expression in the root cortex and leaf phloem. Transgenic *Arabidopsis thaliana* overexpressing PTAC128122 driven by 35S promoter of *Cauliflower mosaic virus* displayed no differences in fresh weight, inorganic phosphate concentration, and visible appearance in comparison with wild-type plants grown under various phosphate supplies, 250, 50, and 10  $\mu$ M phosphate.

In summary, in spite of no noticeable changes during vegetative growth, the expression of a subset of genes and vascular pattern of *Phalaenopsis* are altered, likely as adaptative responses to cope with limited P. Of note, the long term nutrient starvation during the vegetative growth severely affects the flowering of *Phalaenopsis* at the later stage.



# 目錄



|                               |      |
|-------------------------------|------|
| 摘要 .....                      | I    |
| Abstract .....                | III  |
| 目錄 .....                      | V    |
| 表目錄 .....                     | VIII |
| 圖目錄 .....                     | XII  |
| 第一章 緒論 .....                  | 1    |
| 第二章 前人研究 .....                | 3    |
| 一、蝴蝶蘭經濟地位、生育習性及栽培模式 .....     | 3    |
| 二、蘭科作物形態結構之特性 .....           | 4    |
| (一) 蝴蝶蘭的解剖構造 .....            | 5    |
| (二) 蘭科根部構造與養分吸收之關係 .....      | 6    |
| 三、蘭科作物對於礦物營養之吸收、貯藏、分配特性 ..... | 7    |
| 四、大量元素氮、磷、鉀對蘭科作物生長之影響 .....   | 9    |
| (一) 氮 .....                   | 9    |
| (二) 磷 .....                   | 11   |
| (三) 鉀 .....                   | 13   |
| 五、蝴蝶蘭基因體相關之研究 .....           | 14   |
| 六、植物於缺磷下的分子調控機制 .....         | 17   |
| 第三章 蝴蝶蘭於養分逆境下的生長反應 .....      | 20   |
| 摘要 .....                      | 20   |
| 前言 .....                      | 21   |
| 材料方法 .....                    | 22   |
| 試驗材料 .....                    | 22   |
| 試驗場所 .....                    | 22   |

|                                 |           |
|---------------------------------|-----------|
| 試驗設計 .....                      | 22        |
| 調查項目及方法 .....                   | 24        |
| 生物統計分析 .....                    | 26        |
| 結果 .....                        | 27        |
| 一、蝴蝶蘭於短期缺肥下的生長反應 .....          | 27        |
| 二、蝴蝶蘭於長期缺肥下的生長反應 .....          | 28        |
| 討論 .....                        | 33        |
| 一、缺乏氮、磷、鉀對蝴蝶蘭生長的影響 .....        | 33        |
| 二、不同生長階段的蝴蝶蘭於養分缺乏環境下之表現 .....   | 38        |
| 三、養分缺乏對蝴蝶蘭營養生長與生殖生長的影響 .....    | 39        |
| 四、蝴蝶蘭於養分缺乏下的光合作用 .....          | 40        |
| <b>第四章 蝴蝶蘭於缺磷下的形態解剖觀察 .....</b> | <b>63</b> |
| 摘要 .....                        | 63        |
| 前言 .....                        | 63        |
| 材料方法 .....                      | 64        |
| 試驗材料 .....                      | 64        |
| 試驗場所 .....                      | 65        |
| 試驗設計 .....                      | 65        |
| 新鮮切片方法 .....                    | 65        |
| 影像處理與量化方法 .....                 | 66        |
| 生物統計分析 .....                    | 67        |
| 結果 .....                        | 67        |
| 一、蝴蝶蘭形態構造 .....                 | 67        |
| 二、缺磷對蝴蝶蘭形態構造的影響 .....           | 69        |
| 討論 .....                        | 71        |

|                                                                         |     |
|-------------------------------------------------------------------------|-----|
| 第五章 蝴蝶蘭於缺磷下的基因表現 .....                                                  | 85  |
| 摘要 .....                                                                | 85  |
| 前言 .....                                                                | 85  |
| 材料方法 .....                                                              | 86  |
| 試驗材料 .....                                                              | 86  |
| 試驗設計 .....                                                              | 87  |
| 無機磷濃度分析(Inorganic phosphate assay) .....                                | 89  |
| 總核糖核酸萃取(Total RNA isolation) .....                                      | 90  |
| 基因組去氧核糖核酸萃取(Genomic DNA extraction) .....                               | 91  |
| 基因表現分析(Gene expression analysis) .....                                  | 91  |
| 基因構築與阿拉伯芥轉殖(Gene construct and <i>Arabidopsis</i> transformation) ..... | 94  |
| 西方墨點法分析(Western blot) .....                                             | 95  |
| 核糖核酸原位雜交(RNA in situ hybridization, RNA-ISH) .....                      | 96  |
| 生物統計分析 .....                                                            | 97  |
| 結果 .....                                                                | 97  |
| 一、蝴蝶蘭於缺磷下的基因表現驗證 .....                                                  | 97  |
| 二、缺磷逆境對阿拉伯芥 35S::PATC128122 轉殖株之影響 .....                                | 101 |
| 三、原位雜交偵測 PATC128122、PATC144588 於蝴蝶蘭組織之表現位置 .....                        | 103 |
| 討論 .....                                                                | 104 |
| 一、以 RT-PCR 方式驗證微矩陣基因表現之結果比較 .....                                       | 104 |
| 二、蝴蝶蘭於缺磷下大量誘導表現之基因 PATC128122 .....                                     | 106 |
| 三、大量表現 PATC128122 於阿拉伯芥 .....                                           | 107 |
| 四、以原位雜交偵測蝴蝶蘭基因表現位置 .....                                                | 108 |
| 第六章 結論 .....                                                            | 143 |
| 參考文獻 .....                                                              | 145 |

## 表目錄



|                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 表 3.1. 八種不同氮、磷、鉀濃度肥料處理之養液配方.....                                                                                                          | 43 |
| 表 3.2. 缺乏不同氮、磷、鉀濃度 4 週後對蝴蝶蘭( <i>Phalaenopsis Sogo Yukidian</i> 'V3')<br>總葉數、葉長、葉面積及第一片成熟葉長、葉面積、葉綠素計讀值的影響.....                             | 44 |
| 表 3.3. 缺乏不同氮、磷、鉀濃度 4 週後對蝴蝶蘭( <i>Phalaenopsis Sogo Yukidian</i> 'V3')<br>總鮮重、地上部鮮重、地下部鮮重及總乾重、地上部乾重、地下部乾重的影<br>響.....                       | 45 |
| 表 3.4. 缺乏不同氮、磷、鉀濃度 8 週後對蝴蝶蘭( <i>Phalaenopsis Sogo Yukidian</i> 'V3')<br>總葉數、葉長、葉面積及第一片成熟葉長、葉面積、葉綠素計讀值的影響.....                             | 46 |
| 表 3.5. 缺乏不同氮、磷、鉀濃度 8 週後對蝴蝶蘭( <i>Phalaenopsis Sogo Yukidian</i> 'V3')<br>總鮮重、地上部鮮重、地下部鮮重及總乾重、地上部乾重、地下部乾重的影<br>響.....                       | 47 |
| 表 3.6. 缺乏不同氮、磷、鉀濃度 12 週後對蝴蝶蘭( <i>Phalaenopsis Sogo Yukidian</i> 'V3')<br>總葉數、葉長、葉面積及第一片成熟葉長、葉面積、葉綠素計讀值的影響.....                            | 48 |
| 表 3.7. 缺乏不同氮、磷、鉀濃度 12 週後對蝴蝶蘭( <i>Phalaenopsis Sogo Yukidian</i> 'V3')<br>總鮮重、地上部鮮重、地下部鮮重及總乾重、地上部乾重、地下部乾重的影<br>響.....                      | 49 |
| 表 3.8. 在日夜溫 30/25 °C 人候室下，缺乏不同氮、磷、鉀濃度 32 週後對蝴蝶蘭<br>( <i>Phalaenopsis Sogo Yukidian</i> 'V3')總葉數、葉長、葉面積及第一片成熟葉長、<br>葉面積、葉綠素計讀值及抽梗率的影響..... | 50 |
| 表 3.9. 在日夜溫 30/25 °C 人候室下，缺乏不同氮、磷、鉀濃度 32 週後對蝴蝶蘭<br>( <i>Phalaenopsis Sogo Yukidian</i> 'V3')總鮮重、地上部鮮重、地下部鮮重及總乾重、<br>地上部乾重、地下部乾重的影響.....   | 51 |
| 表 3.10. 蝴蝶蘭( <i>Phalaenopsis Sogo Yukidian</i> 'V3')栽培於 30/25 °C 人工氣候室 8 週，<br>接著移至 25/20 °C 人工氣候室 24 週後，缺乏不同氮、磷、鉀處理對總葉數、                 |    |

|                                                                                                                                                           |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 葉長、葉面積及第一片成熟葉長、葉面積、葉綠素計讀值的影響.....                                                                                                                         | 52  |
| 表 3.11. 蝴蝶蘭( <i>Phalaenopsis Sogo Yukidian</i> ‘V3’)栽培於 30/25 °C 人工氣候室 8 週，<br>接著移至 25/20 °C 人工氣候室 24 週後，缺乏不同氮、磷、鉀濃度對整個植株、<br>地上部、地下部、花梗、花朵的鮮重與乾重的影響..... | 53  |
| 表 3.12. 蝴蝶蘭( <i>Phalaenopsis Sogo Yukidian</i> ‘V3’)栽培於 30/25 °C 人工氣候室 8 週，<br>接著移至 25/20 °C 人工氣候室 24 週後，缺乏不同氮、磷、鉀濃度對花梗長、<br>花梗直徑、花朵數、花徑的影響.....          | 54  |
| 表 3.13. 蝴蝶蘭( <i>Phalaenopsis Sogo Yukidian</i> ‘V3’)栽培於 30/25 °C 或 25/20 °C 人工<br>氣候室下，缺乏不同氮、磷、鉀濃度對淨二氧化碳吸收速率的影響.....                                      | 55  |
| 表 3.14. 蝴蝶蘭( <i>Phalaenopsis Sogo Yukidian</i> ‘V3’)栽培於 30/25 °C 或 25/20 °C 人工<br>氣候室下，缺乏不同氮、磷、鉀濃度對光系統 II 最大光子利用效率的影響.....                                | 56  |
| 表 4.1. 蝴蝶蘭於正常施肥與缺磷處理下的根部、中柱、維管束面積.....                                                                                                                    | 75  |
| 表 4.2. 蝴蝶蘭於正常施肥與缺磷處理下，根部外皮層、內皮層的通過細胞與長細<br>胞和中柱的維管束數目.....                                                                                                | 76  |
| 表 4.3. 蝴蝶蘭於正常施肥與缺磷處理下，第一片成熟葉葉片厚度、中肋維管束長<br>度及面積.....                                                                                                      | 77  |
| 表 5.1. 由微矩陣分析結果中，挑出蝴蝶蘭成熟葉片內於缺磷下大量上調或下調之<br>候選基因.....                                                                                                      | 110 |
| 表 5.2. 由微矩陣分析結果中，挑出蝴蝶蘭根部內於缺磷下大量上調或下調之候選<br>基因.....                                                                                                        | 112 |
| 表 5.3. 基因表達驗證及基因構築所用之引子.....                                                                                                                              | 114 |
| 表 5.4. 候選基因分別在微矩陣及 RT-PCR 驗證結果中的表現量倍數差異之比較                                                                                                                | 118 |
| 表 5.5. 無法以 RT-PCR 擴增出產物的候選基因.....                                                                                                                         | 119 |
| 表 5.6. 11 天大的阿拉伯芥野生株與 35S::PATC128122 轉植株，在不同磷肥供應條<br>件下的地上部與地下部鮮重.....                                                                                   | 120 |



|                                                                              |     |
|------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 表 5.7. 11 天大的阿拉伯芥野生株與 35S::PATC128122 轉植株，在不同磷肥供應條件下的地上部與地下部無機磷濃度.....       | 121 |
| 表 5.8. 11 天大的阿拉伯芥野生株與 35S::PATC128122 轉植株，在不同磷肥供應條件下的地上部與地下部無機磷含量.....       | 122 |
| 表 5.9. 20 天大的阿拉伯芥野生株與 35S::PATC128122 轉植株，在不同磷肥供應條件下的地上部與地下部鮮重、無機磷濃度與含量..... | 123 |

## 圖目錄



|                                                                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 圖 3.1. 在肥料處理前，以 Pour-through 介質溶液測定方法監測介質 EC 與 pH 值的變化.....                                                                                                | 57 |
| 圖 3.2. 蝴蝶蘭( <i>Phalaenopsis Sogo Yukidian</i> ‘V3’)栽培於 30/25 °C 人工氣候室，缺乏不同氮、磷、鉀處理(A) 4 週、(B) 8 週、(C) 12 週後對植株外觀形態的影響.....                                  | 58 |
| 圖 3.3. 蝴蝶蘭( <i>Phalaenopsis Sogo Yukidian</i> ‘V3’)栽培於(A) 30/25 °C 人工氣候室 32 週及(B) 30/25 °C 人工氣候室 8 週，接著移至 25/20 °C 人工氣候室 24 週後，缺乏不同氮、磷、鉀處理後對植株外觀形態的影響..... | 59 |
| 圖 3.4. 蝴蝶蘭( <i>Phalaenopsis Sogo Yukidian</i> ‘V3’)栽培於 30/25 °C 人工氣候室 8 週，接著移至 25/20 °C 人工氣候室 24 週後，缺乏不同氮、磷、鉀處理後對植株開花表現的影響.....                            | 60 |
| 圖 3.5. 蝴蝶蘭( <i>Phalaenopsis Sogo Yukidian</i> ‘V3’)栽培於 30/25 °C 人工氣候室 8 週，接著移至 25/20 °C 人工氣候室 24 週後，缺乏不同氮、磷、鉀處理後對植株抽梗率的影響.....                             | 61 |
| 圖 3.6. 蝴蝶蘭( <i>Phalaenopsis Sogo Yukidian</i> ‘V3’)栽培於 30/25 °C 人工氣候室 8 週，接著移至 25/20 °C 人工氣候室 24 週後，缺乏不同氮、磷、鉀處理後對植株開花率的影響.....                             | 62 |
| 圖 4.1. 蝴蝶蘭根部之解剖構造.....                                                                                                                                     | 78 |
| 圖 4.2. 蝴蝶蘭葉片之解剖構造.....                                                                                                                                     | 79 |
| 圖 4.3. 蝴蝶蘭根部之新鮮切片於不同波長螢光觀察下之影像.....                                                                                                                        | 80 |
| 圖 4.4. 蝴蝶蘭外皮層與內皮層之長細胞與通過細胞.....                                                                                                                            | 81 |
| 圖 4.5. 以解剖顯微鏡觀察，蝴蝶蘭於正常施肥與缺磷下，根部分別自根尖往上 1 公分、3 公分、5 公分之橫切面.....                                                                                             | 82 |
| 圖 4.6. 以正立光學顯微鏡觀察，蝴蝶蘭於正常施肥與缺磷下，根部分別自根尖往上 1 公分、3 公分、5 公分之中柱橫切面.....                                                                                         | 83 |

|                                                                                                                                                              |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 圖 4.7. 蝴蝶蘭於正常施肥與缺磷下，第一片成熟葉的中肋之橫切面.....                                                                                                                       | 84  |
| 圖 5.1. 蝴蝶蘭的葉片(A)及根部(B)於正常施肥或缺磷下處理 8、12 週後的無機磷<br>濃度.....                                                                                                     | 124 |
| 圖 5.2. 蝴蝶蘭的葉片及根部的 total RNA 品質.....                                                                                                                          | 125 |
| 圖 5.3. 以跨越內含子之引子擴增蝴蝶蘭葉片及根部之 cDNA 及 gDNA 的肌動蛋白<br>基因片段。mRNA 合成 cDNA 前皆經過去氧核糖核酸酶處理，對照組為蝴蝶<br>蘭葉片與根部的 gDNA.....                                                 | 125 |
| 圖 5.4. 為了驗證微矩陣結果，以 RT-PCR 分析蝴蝶蘭缺磷下其葉片中上調或下調<br>的候選基因，樣本為本試驗中缺磷處理 8、12 週的葉片與根.....                                                                            | 126 |
| 圖 5.5. 為了驗證微矩陣結果，以 RT-PCR 分析蝴蝶蘭缺磷下其根部中上調或下調<br>的候選基因，樣本為本試驗中缺磷處理 8、12 週的葉片與根.....                                                                            | 128 |
| 圖 5.6. 以 RT-PCR 分析基因 PATC128122 在蝴蝶蘭葉片與根部於不同礦物營養缺<br>乏處理 12 週下的表現.....                                                                                       | 130 |
| 圖 5.7. PATC128122 基因(A)與 PATC144588 基因(B)之 mRNA 結構示意圖及原位雜<br>交探針之位置.....                                                                                     | 131 |
| 圖 5.8 表現載體 pMDC32 / PATC128122 之構築.....                                                                                                                      | 132 |
| 圖 5.9. 以 RT-PCR 分析基因 PATC128122 於 11 天大的阿拉伯芥野生株與<br>35S::PATC128122 轉植株的地上部中，在不同濃度的磷充足或缺乏條件下的表<br>現.....                                                     | 133 |
| 圖 5.10. 以西方墨點法分析蛋白質 PHO1、PHT1;4、PHT1;1/2/3 於 11 天大的阿拉<br>伯芥野生株與 35S::PATC128122 轉植株的根部中，在 250 $\mu$ M (A)、50 $\mu$ M (B)、<br>10 $\mu$ M (C)不同濃度的磷處理下的表現..... | 134 |
| 圖 5.11. 11 天大的阿拉伯芥野生株與 35S::PATC128122 轉植株(隨機挑選轉植株 1、<br>5、7 品系呈現)在 250、50、10 $\mu$ M 不同濃度的磷處理下的外觀形態.....                                                    | 136 |
| 圖 5.12. 20 天大的阿拉伯芥野生株與 35S::PATC128122 轉植株於水耕培養下，在                                                                                                           |     |



|                                                                                     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 250、50、10 $\mu$ M 不同濃度的磷處理下的外觀形態.....                                               | 137 |
| 圖 5.13. 鑑定 PATC128122 在蝴蝶蘭與阿拉伯芥 35S::PATC128122 轉植株內的選擇性剪切形式.....                   | 138 |
| 圖 5.14. 以原位雜交偵測 PATC128122 在蝴蝶蘭 <i>Phalaenopsis</i> Sogo Yukidian ‘V3’ 根部的表現位置..... | 139 |
| 圖 5.15. 以原位雜交偵測 PATC128122 在蝴蝶蘭 <i>Phalaenopsis</i> Sogo Yukidian ‘V3’ 葉片的表現位置..... | 140 |
| 圖 5.16. 以原位雜交偵測 PATC144588 在蝴蝶蘭 <i>Phalaenopsis</i> Sogo Yukidian ‘V3’ 根部的表現位置..... | 141 |
| 圖 5.17. 以原位雜交偵測 PATC144588 在蝴蝶蘭 <i>Phalaenopsis</i> Sogo Yukidian ‘V3’ 葉片的表現位置..... | 142 |



## 第一章 緒論



蘭科(Orchidaceae)植物為被子植物中最大並且高度演化的一個家族，其中許多生理特性皆與一般植物不同，例如花朵形態、與蟲媒之間的傳粉關係、景天酸代謝型的光合作用模式、胚珠發育過程及根部的附生性等，並廣泛分布於各地形環境，具有豐富的多樣性(蘇，2011; Atwood, 1986)。蝴蝶蘭(*Phalaenopsis* spp.)屬於蘭科植物中的樹蘭亞科(Epidendroideae)，臺灣為蝴蝶蘭原生種分布的最北端(張，2007)，擁有重要的育種親本。蝴蝶蘭因為具有花形獨特、色彩多樣且觀賞壽命期長的優勢，為全世界花卉市場中最大宗的盆花作物，並且為我國目前重要外銷的旗艦作物。

蝴蝶蘭為附生性(epiphyte)蘭花，附生性植物大多數具有以下生物特性，包括生長緩慢、在水或礦物營養供給貧乏下的環境仍能生存、與避免光輻射等。但目前附生性植物的研究多局限於生態學與分類學的調查(Zotz and Hietz, 2001)。許多前人研究，蝴蝶蘭被指出對於養分逆境具有極高的耐受性，面臨不足的礦物營養逆境時，缺乏徵狀出現緩慢(Hew and Yong, 2004; Susilo and Chang, 2014; Yoneda et al., 1997)，而且蝴蝶蘭於瓶苗、營養生長或生殖生長階段下不同成熟度的植株對於養分缺乏的反應不一致(陳，2014；游，2012；雷，2007)。

Susilo 和 Chang (2014)指出，蝴蝶蘭的葉片與根部組織具有貯藏養分的能力，Zotz 和 Winkler (2013)則指出，蝴蝶蘭根部的根被(velamen)組織具有快速吸收礦物營養並避免流失的功能。但目前關於蝴蝶蘭對養分之吸收、貯藏與利用的生理機制研究仍非常少，大多數著重於產業上生產栽培的應用，例如肥料比例的配置(Wang, 2007; Wang, 2008)。

除了傳統上自植物生理或形態變化進行觀察，蝴蝶蘭 *Phal. aphrodite* 的表達序列標誌(expressed sequence tags, ESTs)已在近幾年被完成定序與註解，並提供完整的資訊於 Orchidstra 網站上(Su et al., 2011; 2013a, b)。藉由比較蝴蝶蘭於養分逆境

下的基因表現變化，可進一步探討蝴蝶蘭於內部的分子調控機制，有助於我們由不同層面瞭解蝴蝶蘭對於養分的吸收與運用機制，甚至對蝴蝶蘭附生特性下的生理機制有更多的瞭解。

本研究目的為蝴蝶蘭於養分逆境下的生長反應觀察，並嘗試以不同的層面來探討。總共分為三個章節，第一個章節為調查蝴蝶蘭分別於缺氮、缺磷與缺鉀下的生理參數，包括葉片生長、植體鮮重與乾重、外觀顏色與缺肥徵狀、光合作用能力等，因為氮、磷、鉀為植物生長所必需之三大要素，缺乏任何一種元素都會對植物的生長與發育造成抑制。但蝴蝶蘭對於養分逆境的反應緩慢，因此，將藉由連續調查蝴蝶蘭於短期或長期下的缺肥反應，並且分別給予不同溫度處理使植株處於營養生長或生殖生長階段，目的為觀察蝴蝶蘭在缺三大要素的逆境下其植物生理與外表型(phenotype)的變化，可做進一步的紀錄與討論。

而氮、磷、鉀三大要素中，磷肥為一有限的礦物資源，主要採自於磷礦石，但目前已經面臨資源耗盡的危機(Cordell et al., 2009)，且因為磷在土壤中常因沉澱或被有機物固定而造成植物獲取不易，因此，研究植物對於磷的獲取與利用為當今迫切的主題，本試驗後續則選擇以缺磷逆境繼續深入探討。

第二個章節是從植物組織細胞的形態解剖角度來觀察，蝴蝶蘭具有肥厚的葉片與根部，且具有一些特殊的結構如根被、加厚明顯的內外皮層(李和李, 1991)，因此希望藉由解剖蝴蝶蘭的組織，給予蝴蝶蘭缺磷逆境，觀察蝴蝶蘭於缺磷逆境下根部與葉片的形態的變化。

第三個章節是從蝴蝶蘭內部基因表現變化層面探討缺磷逆境下的分子調控機制，第一步先驗證游(2012)以微矩陣(microarray)生物晶片技術偵測蝴蝶蘭於缺磷下的基因表現，接下來挑選出受缺磷影響而大量表現的基因作為候選基因，藉由大量表現於阿拉伯芥內、或以原位雜交(in situ hybridization)的方式偵測在蝴蝶蘭植體內的表現位置，期望對於候選基因有更多的瞭解。



## 第二章 前人研究

### 一、蝴蝶蘭經濟地位、生育習性及栽培模式

蝴蝶蘭因花型獨特、花朵壽命長、且花色多樣性，在花卉市場中廣受消費者喜愛。在 2003 年，蝴蝶蘭已經成為世界性花卉市場中重要的經濟作物(Griesbach, 2003)，2013 年，美國盆花市場的年產值中，蘭花即佔了 31.6%，在這 10 年期間，蘭花在美國的批發價格年年攀升，其中蝴蝶蘭占蘭花最大宗，且最大進口國為臺灣(資料來自美國農業部，簡稱 USDA)；在荷蘭，蝴蝶蘭為 2013 年拍賣市場上總值第一之室內植物(資料來自 FloraHolland)；在臺灣，蝴蝶蘭為國內花卉作物中，外銷產值最高之作物，蘭花類即占花卉類總出口值之 86%，其中蝴蝶蘭占了蘭花類中的 70%(資料來自臺灣財政部關稅總局)，顯示蝴蝶蘭為我國重要之經濟作物。

蝴蝶蘭原生於熱帶亞洲及太平洋上的島嶼，氣候終年溫暖而多雨潮濕，蝴蝶蘭多附生於森林或雨林的高樹上，臺灣為蝴蝶蘭原生種最北之所在地，並具有兩種蝴蝶蘭原生種，分別為白花蝴蝶蘭(*Phal. aphrodite*)及桃紅姬蝴蝶蘭(*Phal. equestris*)，皆為育種之重要親本(張，2007)。蝴蝶蘭為景天酸代謝型(Crassulacean acid metabolism, CAM)植物，植株生長緩慢，性喜高溫多濕且通風良好的環境，當遭遇低溫即能誘導抽梗開花，目前國內蝴蝶蘭生產業者皆投入大量成本，興建高規格的精密溫室，透過水牆、風扇、內外網、加溫機或冷氣機等設備進行環控，使溫室內溫度與光度皆維持於蝴蝶蘭最適生長條件，並降低病蟲害發生機率。

基本的蝴蝶蘭栽培模式為，將育種選拔出的植株進行組織培養，以生產分生苗，接著移至溫室進行馴化，隨附生長陸續換盆成小苗、中苗、大苗、至成熟株，最後進行低溫催花而進入消費市場，整個產業可透過分工栽培方式，使每一生產者依其設備或溫室條件，進行其中某一階段之栽培，或透過外銷出口，直接於溫帶地區以涼溫誘導開花，過程更單純、專業而有效率。蝴蝶蘭的栽培介質有水苔、



樹皮、混合椰纖及珍珠石等，臺灣業者目前多以水苔作為栽培介質，並以水苔包覆植體以帶介質方式輸美。水苔具保水保肥之特性，排水性較差，且隨著栽培時間越久，可能會有酸化現象。蝴蝶蘭栽培時間長且成本高，因此精準的肥培管理為縮短產期、控制風險及提高品質之關鍵。業者特別重視肥料的配方及施肥頻率、方式等，目前大部分業者多以逆滲透水為灌溉水源，以降低肥料之電導度(electrical conductivity, EC)值，避免發生鹽害，並時常監測介質酸鹼值(pH value)，確認養分在介質中的有效性(沈，2007)，部分業者甚至利用葉面施肥補充鈣、鐵元素等，目的皆為生產出健壯且品質佳的蝴蝶蘭苗株。

## 二、蘭科作物形態結構之特性

蘭花植物依據其棲息地分有，附生蘭(epiphytic orchids)，如蝴蝶蘭、石斛蘭與文心蘭等；地生蘭(terrestrial orchids)，如國蘭與仙履蘭等，附生蘭佔了蘭科植物的75% (Moreira and Isaias, 2008)。附生型植物棲息方式為根部吸附在樹幹、枝條或岩石的表面上，但根部並不會穿入物體中，僅以吸附的方式將物體當作支持物，以便爭取更大量的陽光(林，2004)，因此附生蘭在生長環境上面臨的主要劣勢為不穩定的水分及少量且間歇的養分供給。

附生蘭的氣生根通常暴露於空氣中，或緊貼支撐的結構物；而地生蘭的根則通常埋藏在土壤裡，相較於附生蘭較易獲得土壤中的養分(Hew and Yong, 2004)，比較兩者的組織結構，根部結構相似，附生蘭的根部周徑(perimeter)較小，具較多層的根被，而地生蘭類大部分的根部周徑較大，其中有些地生蘭的結構較特殊，例如，地生蘭 *Habenaria petalodes* 表皮組織沒有特化成根被層，由單層表皮細胞構成；地生蘭 *Prescottia oligantha* 的內皮層可觀察到卡氏帶(casparian strips)結構 (Moreira and Isaias, 2008)。另外，Moreira 和 Isaias (2008)以根部周徑與早成木質部(protoxylem)個數比值代表水分與礦物營養在根部皮層內的傳導效率，結果顯示，多數附生蘭的周徑與早成木質部個數比值低於地生蘭，附生蘭具有較佳的傳導效率。另外，附生蘭為了適應棲地環境，被認為分化出具有助於水分、養分吸收與

貯藏的構造，例如多層且像海綿狀的根被、木質化的內皮層與外皮層，其結構可有效防止水分蒸散(Benzing, 1986; Benzing et al., 1983; Pridgeon, 1986)。



### (一) 蝴蝶蘭的解剖構造

蝴蝶蘭(*Phalaenopsis* spp.)屬於附生蘭，具厚而多肉的葉及肥大的氣生根(aerial roots)，其根部構造與一般植物類似，具根帽(root cap)、表皮組織(epidermis)、皮層(cortex)和中柱(vascular cylinder)等四部份，根部外層特化為根被(velamen)和外皮層(exodermis)，皮層內部有一層內皮層(endodermis) (李和李，1991; Bercu et al., 2011)。

根被(velamen)為根部外層特化組織，具木質化和木栓化特性，成熟後為死細胞，在不同蘭科植物中具多樣形狀，如多邊形、橢圓形或矩形等(Oliveira and Sajo, 1999)。根被具即時吸收水分並暫時貯存的功能，也能防止水分從皮層散失，而根被的構造如海綿，可暫時作為水分及礦物質的貯藏庫(李和李，1991; Moreira and Isaias, 2008; Zotz and Winkler, 2013)。蝴蝶蘭台灣阿嬤(*Phal. amabilis*)具2-3層根被，其他蘭科植物根被層有些多達8-12層(Pridgeon, 1987)。文獻指出，根被層數不會受環境影響，但會影響細胞分化的大小，繼而影響根被厚度(Moreira and Isaias, 2008)。蝴蝶蘭根部表面上可觀察到有一些白斑狀分布，此構造稱為通氣組織或被裂孔(pneumathode)，可能為非常稠密的螺旋式細胞壁加厚現象，推測其功用是當環境充滿飽和濕氣時，提供氣生根作氣體交換(李和李，1991)。

蝴蝶蘭的根被內層為一高度特化之細胞層，稱為外皮層(exodermis)，發育成次生細胞壁，並由兩種細胞組成，第一種為長細胞(long cell)，細胞壁沿外切線(outer tangential line)和徑線(radial line)加厚，呈倒U型加厚現象，開口朝向皮層，利於防止水分散失；另一種為短細胞(short cell)，又稱通過細胞(passage cell)，較小且具緻密的細胞質，利於通氣及水分與養分的橫向運輸(李和李，1991; Chiang, 1970)。除了倒U型加厚型態，其他蘭科植物的外皮層中，也有整個細胞壁加厚，呈O型

加厚型態，或是僅外切線細胞壁加厚的例子(Moreira and Isaias, 2008; Oliveira and Sajo, 1999)。



皮層(cortex)與維管束組織之間也具有一層細胞壁加厚的組織，稱內皮層(endodermis)。蝴蝶蘭的內皮層同樣具有長細胞和通過細胞，長細胞為內切線(inner tangential line)、外切線和徑線的細胞壁皆會連續性加厚，為O型加厚型態，而薄壁的通過細胞間插在其中，並與維管束的韌皮部相對，利於水分和養分的橫向運輸(李和李, 1991)。其他蘭科植物的內皮層中，除了O型加厚型態，也有U型加厚的例子，如 *Miltonia flavescens*、*Dichaea bryophila* (Oliveira and Sajo, 1999)。

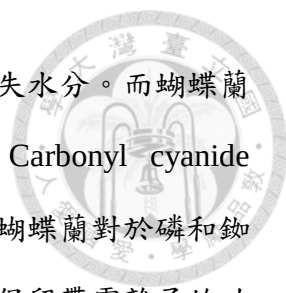
根部外皮層與內皮層中間的組織為皮層，主要由薄壁細胞構成。皮層細胞富含水分，並含葉綠體、澱粉粒及液胞。綠色根的外皮層細胞含有葉綠體，越靠近皮層外圍的細胞內，葉綠體含量越多，可幫助行光合作用，並貯藏養分(李和李, 1991)。

蘭科植物除了具有特殊的根部結構之外，以蝴蝶蘭為例，蝴蝶蘭的莖部為短縮莖，主要結構為維管束組織，以運輸水分與養分的功能為最發達。蝴蝶蘭具有肥厚的葉片，葉肉細胞(mesophyll cell)靠近表皮者較內部者為小，且細胞間隙(intercellular air space)多，可能有利於氣體交換。

## (二) 蘭科根部構造與養分吸收之關係

蘭科植物根據物種不同，根被層數皆不一樣，Hew 等(1993)研究中，地生蘭 *Bromheadia finlaysonia* 有2層根被，其吸收硝酸鹽的速率為  $0.41 \mu\text{mole} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ ，而地生蘭 *Cymbidium sinense* 與附生蘭 *Dendrobium* 'White Fairy' 的根被層有10層，但其吸收硝酸鹽的速率分別為  $0.33$  及  $0.94 \mu\text{mole} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ ，顯示根被層數多寡非影響養分吸收效率的因子，可能與物種間特性有關。Went (1940)提出假說，根被層具有自雨水中立即吸收且固定液體的功用，尤其是帶有電荷的離子，因此在 Zotz 和 Winkler (2013)的研究中，10種蘭科植物的根可在澆水15秒後吸水能力達到飽和，





但水分流失速度很慢，根被較厚的植物超過 1 小時才會漸漸流失水分。而蝴蝶蘭的氣生根對磷、鉀的吸收呈現二相式動力，利用添加 Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP)作為 ATPase 抑制劑，可觀察到蝴蝶蘭對於磷和鉀的吸收為主動吸收(Zotz and Winkler, 2013)。蝴蝶蘭的根被具有保留帶電離子的功能，因為當蝴蝶蘭的根被被剝除後，流失帶電離子的速度變快；而有無根被不會影響不帶電的葡萄糖在根部內的保留狀況，主要與根部的活力有關，此研究證明在礦物營養來源稀少的環境下，根被具有保留養分的重要功用(Zotz and Winkler, 2013)。

蘭科植物根部的外皮層也具有一些特殊構造，可能與植物對養分吸收的影響有關，如外皮層上具有細胞壁不加厚的通過細胞，而通過細胞與根被的結合處常伴隨一種特殊的結構，稱為纖維體(fibrous bodies)，此結構可阻止水分自根部蒸散，纖維體可能像單向調節的閥(one way valve)一樣，在根被充滿水時會膨脹，有利水分往內送，當根部缺水時呈壓縮狀，不利水分外流(Benzing et al., 1982)。

### 三、蘭科作物對於礦物營養之吸收、貯藏、分配特性

在蘭科植物的切花商品中，如蝴蝶蘭、文心蘭、萬代蘭、春石斛等，其中相似的一項特點為，其親本皆為附生蘭(Hew and Yong, 2004)，而附生性植物在原生環境下大部分皆面臨一些劣勢，例如陽光不足、不穩定的水分供給、少量且間歇的養分供給，在養分獲取方面，附生蘭多生長在熱帶雨林的樹冠上，養分可能主要源自空氣中的雨水、霧、塵，或樹木淋洗釋放出的礦物質(Zotz and Hietz, 2001)，因此使附生蘭演化出對極少的養分仍能有效利用的特性，並且可能具有獨特的機制於養分吸收、轉運、貯藏等功能調節上。

目前，關於蘭科植物的組織或細胞形態對於養分吸收的影響相關方面文獻不多。除了已提及的，附生蘭因根部具有特化的根被組織，具快速吸水之特性，根部可於 15 秒內吸水達到飽和(Zotz and Winkler, 2013)。另外，利用穩定性同位素



$N^{15}$  追蹤法，得知蝴蝶蘭與文心蘭皆可以透過葉片與根部吸收肥料，吸收及運移氮素的效率以新根最高，老根次之，施肥 0.5 天後，肥料氮即可被根部吸收並運移至植體各部位，葉片吸收效率較差，且葉片上下表面無差異，而葉面吸收效率不受氣孔密度影響(郭，2012; 彭，2008; Susilo et al., 2013)。文心蘭根部、葉片及假球莖含硝酸還原酶，偏好吸收硝酸態氮，根部內的硝酸還原酶活性隨根齡越老而下降(郭，2012)，蝴蝶蘭栽培適合施用銨態氮與硝酸態氮比例 25:75 之肥料(彭等，2010)，但蝴蝶蘭根部也具有直接吸收尿素之能力(Trépanier et al., 2009)。

附生性蘭花中，依莖部發育形態可分為單莖類(monopodial)與複莖類(sympodial)蘭花，複莖類蘭花主要具有假球莖(pseudobulb)，如文心蘭、石斛蘭、嘉得麗雅蘭等，假球莖為整片葉片底下莖幹膨大的一部分，為一特化結構，由薄壁細胞組成，主要具貯藏水分及養分之能力(許，2010; Ng and Hew, 2000; Zotz, 1999)。在當代假球莖發育期間，氮、磷、鉀三大元素的含量逐漸增加，前代與第二前代之假球莖之氮、磷、鉀含量逐漸下降，在花梗發育及開花期間，氮、鉀含量於當代假球莖中下降，供給花梗與花朵需要，顯示假球莖發育時期累積的礦物營養為提供花序和新芽發育的重要供源(source) (Hew and Ng, 1996)。利用穩定性同位素  $N^{15}$  標定肥料氮，文心蘭 *Oncidium Gower Ramsey* 於營養生長期將肥料氮先供予假球莖發育並儲存，在花梗發育時便釋放部分氮供其開花所需，待進入下一個開花週期，仍能於新的花梗偵測到前一個週期之肥料氮，顯示文心蘭假球莖具貯藏並分配氮肥之能力(郭，2012)。

蝴蝶蘭為單莖類蘭花，莖部為短縮莖，但具有肥厚之葉片與根，當使用穩定性同位素  $N^{15}$  標定肥料氮，探討蝴蝶蘭 *Phal. Sogo Yukidian* 'V3' 對氮素之貯存與分配特性，其結果顯示蝴蝶蘭葉片與根部具有貯存氮素之能力，且成熟葉為主要貯藏與進行分配之位置，在營養生長期間，新葉與新根為主要積儲(sink)組織，植體依照積儲強度進行分配氮素，葉齡越大，積儲強度越弱(彭，2008; Susilo et al., 2013)，當植株轉換至生殖生長階段後，花序成為最強的積儲，其中，43%來自於營養生長



期間施用的肥料氮，51%來自自於生殖生長期間施用的肥料氮，且小、中、大苗各營養生長階段貯存之氮素，皆能供應花序生長(Susilo et al., 2014)，當催花期間斷肥，營養生長期施用的肥料氮在花梗的比例從43%增加至89% (Susilo and Chang, 2014)，以上結果皆顯示出，蝴蝶蘭具有良好的貯存礦物營養能力，在長久的栽培過程中，所施用之肥料皆被有效貯藏並隨著不同發育階段而進行分配。

除了附生蘭對於養分具有高效率之利用特性，地生蘭的根部直接接觸土壤，其根部演化出與菌根菌共生模式，班葉蘭 *Goodyera repens* 其根部可透過菌絲獲取碳、氮、無機磷等養分供其生長所需(Cameron et al., 2006; 2007)。

#### 四、大量元素氮、磷、鉀對蘭科作物生長之影響

氮(nitrogen, N)、磷(phosphorus, P)、鉀(potassium, K)、鈣(calcium, Ca)、鎂(magnesium, Mg)、硫(sulfur, S)為植物生長所必須之六大元素，含量占生物總重量0.1%以上，因此又稱為大量元素(Maathuis, 2009)。礦物營養適當比例的供給，可使栽培作物具有最佳的生長速度及品質，但蘭科作物對養分的吸收會受到本身物種特性、生長階段、環境條件及栽培介質而有所影響，目前蘭花栽培常使用的介質有水苔、樹皮或泥炭土等，因此不同的栽培方式會搭配不同的肥培管理，養分肥料如何施用及用量則成為生產者非常重視且經常討論的課題。

##### (一) 氮

氮於植物體內重要的功能為提供胺基酸上的胺基，組成蛋白質，或是構成核酸上嘧啶、嘌呤的主要成分；另外，氮參與生物體內的訊息傳遞、蛋白質調節，或為組成輔酶、光合色素、二次代謝物、多胺的成分之一(Maathuis, 2009)。在一般作物栽培上，葉片中的氮含量與二氧化碳同化效率、生物質量(biomass)蓄積具高度相關性，繼而影響作物產量(Sinclair and Horie, 1989)。缺氮會使高粱(*Sorghum*)的光合作用速率降低、葉面積與葉綠素濃度明顯減少，繼而減少植物生長及乾物重累積(Zhao et al., 2005)。番茄(*Lycopersicon esculentum* L.)於缺氮下葉片水分潛勢

沒有差異，但光合作用速率、氣孔導度與  $F_v/F_m$  值下降，葉片澱粉含量增加及光合產物分配受抑制(Guidi et al., 1997)。

蘭科作物中，不同物種對於氮肥的需求不同，蝴蝶蘭(*Phalaenopsis*)、蕙蘭(*Cymbidium*)於氮肥濃度 100 ppm 下，具有最大的乾重、葉片數與葉面積，但蕙蘭於氮肥濃度 50 ppm 下，即出現老葉葉尖枯萎之現象，而嘉德麗雅蘭(*Cattleya*)則在氮肥濃度 50 ppm 生長最佳，氮肥濃度越高，造成植體各部位之乾重皆下降(Poole and Seeley, 1978)。而施用不同複合肥料予蝴蝶蘭幼苗時，施用較高的氮肥(200  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )，植株會有較高鮮重與較大葉寬，並加快葉片生長速率、縮短幼年期(Wang, 1996)。當氮肥濃度由 50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  增加至 200  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，可提升蝴蝶蘭之開花品質，增加花朵數與花梗長度、新葉數(Wang and Gregg, 1994)。蝴蝶蘭在栽培過程中會吸收並貯存各階段的肥料氮，當葉片中養分充足時，在生殖生長期間，可作為供源提供氮素予花梗和新葉生長，當遭遇施肥中斷或減少，僅造成相對輕微地降低開花品質，例如花朵數減少、新葉生長減緩，其他如開花時間及花朵壽命皆不受影響(雷，2007; Susilo and Chang, 2014; Susilo et al., 2014; Wang, 2000)。然而，相對於缺磷、缺鉀逆境，較長時間的缺氮會使蝴蝶蘭生長勢下降，出現葉片黃化、落葉、植株鮮重及乾重降低情形(游，2012; Yoneda et al., 1997)。

其他蘭科作物如臺灣一葉蘭(*Pleione formosana*)、香草蘭(*Vallina fragrans*)、石斛蘭(*Dendrobium nobile*)在分別缺乏氮、磷、鉀環境下時，缺氮之徵狀皆較明顯嚴重，缺氮會造成臺灣一葉蘭(*Pleione formosana*)當年生葉片黃化且面積減小、葉綠素含量減少、鮮重及乾重降低，缺氮長達 2 年後，葉片中蛋白質降解，甚至子球發育差(宋，1986; 郭，1984)；香草蘭(*Vallina fragrans* Ames)在處理三個星期後可見缺氮徵狀，葉片黃化、枝條與葉片生長量較對照組減少 64%，外觀生長不良(Cibes et al., 1947)；石斛蘭(*Dendrobium nobile* Red Emperor 'Prince')隨著施用的氮肥濃度降低，株高下降、葉片數及假球莖節數減少、花朵數減少，完全缺乏氮肥之處理，外觀弱小、落葉嚴重，石斛蘭以氮肥 100-200  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  為最佳施肥濃度，氮肥過多(400

mg·L<sup>-1</sup>), 反而造成花朵數下降(Bichsel et al., 2008); 齒舌蘭(*Odontioda* Lovely Morning ‘Sayaka’)於缺氮處理下 9 個月, 葉片數與葉面積沒有差異, 但葉片顏色較淺白, 其假球莖直徑顯著變小、根數減少、花梗縮短變細、花朵數減少且開花提早(Yoneda et al., 1999)。

不同氮素型態也會影響蘭科作物的吸收利用, 繼而影響植株之生長與發育, 蝴蝶蘭(*Phal.* Blume × *Taisuco* Kochdian)隨著施用的硝酸態氮(NO<sub>3</sub>-N)之肥料比例越高, 新葉之葉長與葉寬增加、抽梗與開花時間提早、花梗長度與花朵數增加(Wang, 2008)。蝴蝶蘭(*Phal.* Sogo Yukidian ‘V3’)在施用的銨態氮(NH<sub>4</sub>-N) 之肥料比例增加下, 植株鮮重、葉片數及葉面積降低, 而長期施用銨態氮比例超過 50%的肥料, 抽梗率、花朵數及花梗長度皆下降, 甚至造成植株生長停滯、根部壞死等銨毒害現象, 因此推薦使用銨態氮與硝酸態氮比例為 25:75 之肥料予蝴蝶蘭, 植株生長品質最佳(彭等, 2010)。蝴蝶蘭於組織培養的階段, 添加銨態氮於培養基中, 也會造成組培苗的葉片數、葉面積與根長度減少(Kubota et al., 2000); 而文心蘭亦偏好吸收硝酸態氮, 銨態氮與硝酸態氮比例為 1:6 時, 開花品質最佳(林等, 1999; 郭, 2012)。

## (二) 磷

磷為組成核酸的重要分子, 如遺傳物質去氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)及核糖核酸(ribonucleic acid, RNA); 或組成三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP), 作為細胞內儲存或傳遞化學能之形式; 或構成磷脂質, 以雙層磷脂結構排列組成細胞膜; 另外, 藉由激酶(kinase)和磷酸酶(phosphatase)之磷酸化和去磷酸化的活性以調控細胞內蛋白質的生理功能。因此, 磷在植物體內生理與代謝上扮演不可或缺的角色。另外磷以肌醇六磷酸(inositol-hexa-phosphate, IP<sub>6</sub>), 又稱植酸(phytic acid), 之形式貯存於多種植物之種子內, 影響胚發育與發芽(Maathuis, 2009)。



在一般作物中，缺磷會抑制葉片擴張及光合作用，進而導致生長受阻、產量降低，其中，葉面積對於磷的供應尤其敏感(Fredeeen et al., 1989; Lynch et al., 1991)。當菜豆(*Phaseolus vulgaris* L.)於缺磷環境下，首先會減少地上部的節點、分枝，繼而降低葉片數、葉片變小(Lynch et al., 1991)；黃豆(*Glycine max* [L.] Merr. cv. Ransom)缺磷處理於發芽後 32 天，植株乾重及地上部/地下部比值(shoot / root ratio)降低，總葉面積顯著低於對照組，且葉片生長速度減緩，葉片數減少，雖然莖頂分生組織的大小與細胞數沒有影響，但新葉創始的細胞分化速度於缺磷兩週後下降，而葉片表皮細胞大小沒有差異，但葉肉細胞之分裂受到抑制，發育速度遲緩，葉片變薄(Chiera et al., 2002)；棉花(*Gossypium hirsutum* L.)於缺磷處理下，根部導水率下降，造成葉片生長受到抑制(Radin and Eidenbock, 1984)；模式植物阿拉伯芥於缺磷下其地上部/地下部比值降低，藉由增加根部生長、促進側根及根毛增生以獲取介質中更多的磷(Hermans et al., 2006; Williamson et al., 2001)。

蘭科植物中，磷肥對於植株的生長影響相較於氮肥較不顯著。當石斛蘭(*Dendrobium nobile* Red Emperor ‘Prince’)施用 25-100 mg·L<sup>-1</sup> (低磷-正常)濃度的磷肥時，展開葉片數、假球莖的節數與厚度皆沒有差異，僅株高隨著磷肥濃度減少而下降，但當磷肥完全缺乏時(0 mg·L<sup>-1</sup>)，則假球莖節數與厚度、展開葉片數則顯著下降(Bichsel et al., 2008)；而齒舌蘭(*Odontioda* Lovely Morning ‘Sayaka’)於完全缺乏磷肥(0 mM)之處理下，會造成球莖變小、根長度降低，但施予 0.5-2 mM 之磷肥，皆不會造成植株葉數、葉面積、開花率、花朵數目及大小有差異(Yoneda et al., 1999)，顯示石斛蘭及齒舌蘭在低磷濃度下即可維持正常生理，但不能完全缺乏磷肥。臺灣一葉蘭(*Pleione formosana*)分別長期缺乏氮、磷、鉀試驗中，植株以缺氮徵狀最嚴重，缺磷處理則次之，缺磷之植株葉綠素含量高、但光合作用速率降低，呼吸作用上升(宋，1986)。缺磷於三個月後造成香草蘭(*Vallina fragrans* Ames)生長受抑制、葉片於葉尖及邊緣產生黃化、壞疽，最終枯萎(Cibes et al., 1947)。在文心蘭(*Oncidium* ‘Gower Ramsey’ 及 *Oncidium* ‘Volcano Queen’)栽培期間不施用磷肥，

對植株之生長沒有影響，但會縮短其切花壽命(侯，2007)。

磷對蝴蝶蘭的生長與開花影響較不顯著，蝴蝶蘭大苗栽培於 0、0.7、1.4、2.1 mM 濃度之磷肥下，抽梗時間與花朵品質於第一和第二開花週期皆不受影響(雷，2007)。於催花期間提高磷肥濃度對蝴蝶蘭後續開花品質亦無影響(Wang, 2000)。但缺磷現象可能也因植株材料本身不同而異，當蝴蝶蘭處於缺磷逆境下，缺磷會導致落葉並減緩新生葉片的生長，老葉變紫紅色，此外，蝴蝶蘭光合作用效率降低造成植株生長發育遲緩，乾重下降，尤以缺磷較為顯著，開花表現上，則會抑制蝴蝶蘭抽梗(游，2012; Yoneda et al., 1997)

### (三) 鉀

鉀在植物體內扮演調節細胞內電解質與膨壓的功能，調節細胞質與液胞內外水分進出，影響植物體內木質部及韌皮部中水分與養分輸送，或調節氣孔開關，另外部分酶藉由鉀離子影響其活性，因此鉀也參與植物生理代謝路徑的調控(Maathuis, 2009)。在一般植物中，大豆(*Glycine max* L. c.v. Tiefeng 31)於缺鉀下氣孔導度降低，且細胞間隙二氧化碳濃度亦降低，繼而影響光合作用效率，與鉀影響氣孔開關有關。棉花(*Gossypium hirsutum* L.)則於缺鉀下，光合作用速率降低，且醣類累積在葉片中，葉綠體內累積大量的澱粉，維管束中光合產物之運移(translocation)受阻，導致最終乾重與葉面積下降(Li et al., 2011)，缺鉀因影響光合作用效率、氣孔導度與維管束中運移現象，最終導致許多作物如玉米、棉花、菜豆等乾重累積下降，產量與品質變差(Pettigrew, 2008)

蘭科作物中，陳(2001)調查抽梗後葉片產生黃斑、黃化之蝴蝶蘭(*Phal.* Taisuco Swan、*Phal.* TS365、*Phal. amabilis*)，發現植體內鉀元素顯著偏低，且基部下位葉的鉀含量較上、中位葉更低，推測葉片黃化為缺鉀所導致。雷(2007)調查蝴蝶蘭(*Phal. amabilis*)在生殖生長期間植體的礦物營養濃度之消長，在花朵發育至盛花期，下位葉之鉀含量下降，花朵之鉀含量則逐漸增加，顯示蝴蝶蘭的花序發育需要較大量



的鉀，而鉀肥濃度增加，可使蝴蝶蘭於處理後第二個開花週期，花梗直徑與花朵數增加。Wang(2007)施予不同濃度之鉀肥予蝴蝶蘭(*Phal. Taisuco Kochdian*)，不論種植於水苔或樹皮，鉀肥濃度越高，花梗長度、花梗直徑、花朵數及花徑皆增加，但不影響新葉生長速度；而種植於樹皮的蝴蝶蘭於低鉀( $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )或完全缺鉀下，在開花期間，葉片會發生黃化、壞疽，甚至植株死掉，種植於水苔的蝴蝶蘭於完全缺鉀( $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )下，無開花現象。游(2012)亦發現，長時間缺鉀下的蝴蝶蘭(*Phal. Sogo Yukidian* ‘V3’)有上位葉黃化之現象，且花梗、花朵佔了總植株 70%以上的鉀元素。

缺鉀亦會影響齒舌蘭(*Odontioda* Lovely Morning ‘Sayaka’)之開花表現，當施予 5 mM 濃度或完全沒有鉀肥時，花梗直徑及長度皆下降，花朵變小，且延後開花時間，但不影響植株之葉片數與葉面積，而完全缺鉀下，球莖直徑較低(Yoneda et al., 1999)；香草蘭(*Vallina fragrans* Ames)在營養生長期間，缺鉀之徵狀則不明顯，僅葉片與莖稍微縮小，且葉片變暗綠色(Cibes et al., 1947)；在臺灣一葉蘭(*Pleione formosana*)中，發現子球可儲藏礦物營養，尤以氮和鉀最多，缺鉀之徵狀於臺灣一葉蘭不明顯，但會造成光合作用速率下降、氣體擴散阻力增加(宋, 1986; 郭, 1984)；石斛蘭(*Dendrobium nobile* Red Emperor ‘Prince’)則在缺鉀下，植株之株高、假球莖縮小、葉片數下降、落葉嚴重，且假球莖節數減少，造成花朵數降低(Bichsel et al., 2008)。綜合以上結果，指出鉀元素對蘭科作物花梗與花朵發育之影響重要，在營養生長期間，低鉀對於蘭科作物影響不明顯，可能與不同階段其需求性不同有關，或體內對於鉀具高效利用之能力。

## 五、蝴蝶蘭基因體相關之研究

蘭科(Orchidaceae)植物為被子植物中最大的一個科(Atwood, 1986)，且具有一些特殊的生物性狀，如花朵形態(Rudall and Bateman, 2002)、與蟲媒之間的傳粉關係(Cozzolino and Widmer, 2005)、景天酸代謝(CAM)型的光合作用模式(洪, 2012; Guo and Lee, 2006)、胚珠發育過程(Yu and Goh, 2001)及附生(epiphytism)特性



(Silvera et al., 2009)等，皆有別於一般模式植物如阿拉伯芥、水稻，而蘭科植物為臺灣重要的經濟作物，且國內擁有豐富的原生種與栽培品種資源，為了更深入瞭解以上生物特性與基因的分子調控層面之間的關係，目前國內許多學者陸續投入蘭花基因體相關的研究(Chao et al., 2014; Fu et al., 2011; Hsiao et al., 2011; Hsing, 2011; Hsu et al., 2011; Su et al., 2011; 2013a; Tsai et al., 2013)。

蘭科植物的基因組通常較大，且物種間基因組大小相差高達 168 倍( $1C = 0.33-55.4 \text{ pg}$ )，其中以樹蘭亞科(Epidendroideae)物種間差異最大(Leitch et al., 2009)。蝴蝶蘭(*Phalaenopsis* spp.)為目前基因體研究較廣且詳細的物種。*Phalaenopsis aphrodite* 為臺灣重要的蝴蝶蘭原生種，育種上以其白色且大花特性作為重要親本，具二倍染色體( $2n = 2x = 38$ )，基因組大小約為  $1C = 1.4 \text{ pg}$  (Lin et al., 2001)。因此，Su 等(2011)以 *Phal. aphrodite* 作為蝴蝶蘭基因組研究的模式蘭花作物，取植物不同發育階段的組織包括葉片、莖、根、花梗、花苞、發芽種子等 cDNA 樣本，以 Roche 454 和 Illumina/Solexa 兩高通量次世代定序儀(next generation sequencer, NGS)，進行表達序列標誌(expressed sequence tags, ESTs)的定序工作，並接著將序列組裝(assembly)及註解(annotation)，最後總計有 233823 個重疊群(contigs)，其中 42590 個重疊群經過 Blastx 分析與 NCBI 基因庫比對後( $E\text{-value} < 1e-10$ )，已被註解為已知基因，平均長度為 875 bp，其中具有 1275 個轉錄因子(transcription factors)，以 zinc finger proteins 所佔比例最高(41%)，其次為 MYB (17%)、NAC (8%)等轉錄因子，另外具有 946 個轉運蛋白(transporters)，739 個激酶(kinases)；而 191233 為未知的轉錄序列，其中可能具 non-coding RNA、miRNA precursor 等非蛋白質編碼序列，具基因調控功能，針對 48 個長度大於 900 bp 的 contigs 進行 PCR 擴增及定序驗證，結果顯示組裝的正確性高達 99.9%，最後，以上的基因資訊目前公開於蝴蝶蘭基因資料庫 Orchidstra 網站(<http://Orchidstra.abrc.sinica.edu.tw>) (蘇等，2011; Su et al., 2011)。另外，對 miRNA 的研究發現，在 *Phal. aphrodite* 中包含 181 個經其他植物實驗驗證的已知 miRNA(Chao et al., 2014)。而臺灣另一個蝴蝶蘭原生種為姬蝴蝶蘭。



蝶蘭 *Phal. equestris*，是育種上紅花與小花品系之重要親本，與具有濃厚香味之大葉蝴蝶蘭 *Phal. bellina*，皆已針對其花朵組織建立 EST 資料庫(Hsiao et al., 2006; Tsai et al., 2006)，並且兩者皆具二倍染色體( $2n = 2x = 38$ )，*Phal. equestris* 基因組大小約為  $1C = 1.7 \text{ pg}$ ，*Phal. bellina* 約  $1C = 7.5 \text{ pg}$  (Lin et al., 2001)。除了 Orchidstra 資料庫，OrchidBase 資料庫提供 *Phal. aphrodite*、*Phal. equestris*、*Phal. bellina* 來自不同組織，共 37979342 個序列，其中包含 8501 個重疊群(contigs)及 76116 個單獨體序列(singletons) (Fu et al., 2011)。OrchidBase 2.0 資料庫陸續更新增加了 10 種蘭科作物的成熟花苞之基因體資訊，其中共有 1562071 個單一基因(unigenes)，並加以註解及分類(Tsai et al., 2013)。

除了蝴蝶蘭屬基因體資料庫的建立，文心蘭、扇形文心蘭、石斛蘭、蕙蘭皆已進行基因體定序、註解及基因功能性的研究(Chou et al., 2013; Huang et al., 2014; Lin et al., 2013a; Zhao et al., 2013)，其中包含南西文心蘭 *Oncidium* ‘Gower Ramsey’ 的 *OncidiumOrchidGenomeBase* (OOGB) 資料庫(Chang et al., 2011)及石斛蘭 *Dendrobium nobile*(Liang et al., 2012)、*Dendrobium officinale*(Zhao et al., 2013)的 ESTs 分析。而 Su 等(2013a)自定序結果或 GenBank 資料庫中，整合了六種蘭科植物的轉錄體(transcriptome)資訊，包括 *Phal. aphrodite*、*Phal. equestris*、*Phal. bellina*、*Oncidium* ‘Gower Ramsey’、*Dendrobium nobile*、*Erycina pusilla* 皆屬於樹蘭亞科植物，並分別利用 Gene Ontology (GO)、KEGG、Pfam 等進行功能性註解，公開於 Orchidstra 網站，利於研究人員對蘭科作物基因表達層次、分子調控機制上做更深入的研究。

另外 Su 等(2013a, b)根據 *Phal. aphrodite* 之轉錄體序列，設計微矩陣生物晶片(microarray gene-chip)，以應用於基因表達之研究。第一代的蘭花晶片格式為 Agilent (Agilent, Santa Clara, CA, USA) 4×60K，共含有 43662 個已註解基因(annotated genes)、67038 探針(probes)，探針長度 60 bp；第二版的蘭花晶片經過改良，為 Agilent 8×60K 格式，共含 42973 個探針包括 42608 個蝴蝶蘭已註解基因、349 個非編碼

RNA (non-coding RNAs)、8 個內校正基因(endogenous housekeeping genes)、4 個齒舌蘭輪斑病毒(*Odontoglossum ringspot virus* , ORSV) 基因和 4 個蕙蘭嵌紋病毒(*Cymbidium mosaic virus*, CymMV) 基因。



## 六、植物於缺磷下的分子調控機制

磷(phosphorus, P)為植物生長與繁衍所必須之大量元素，為組成遺傳物質、細胞膜等成分，並參與能量轉移、酵素反應與訊號傳遞等重要生理生化反應(Maathuis, 2009)。而植物獲取磷的方式，主要自根部吸收土壤中的無機磷酸鹽(inorganic phosphate, Pi) ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  或  $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$ )，但土壤中的磷酸鹽大部分與陽離子鍵結而沉澱，或被土壤中的微生物轉化成有機磷，導致植物無法吸收利用，因此，一般作物栽培上大多必須由化學肥料供應充足的無機磷肥(Raghothama and Karthikeyan, 2005; Shen et al., 2011)。然而，植物在面臨磷肥獲取不易的環境下時，植物將藉由調整其根部形態、生理生化反應機制、分子層面調控來加強對於磷酸鹽的吸收與利用，其中包含調整植物體內部磷酸磷的分配、重新利用及節省消耗等，藉由一些獨特的缺磷逆境反應基因(phosphate-starvation-responsive genes, PSR genes)傳遞訊號並調整磷酸鹽的吸收與運移(Chiou and Lin, 2011; López-Arredondo et al., 2014; Lin et al., 2009; Liu et al., 2014; Yang and Finnegan, 2010; Zhang et al., 2014)。

植物面臨缺磷逆境下時，Pi、miRNA、鈣離子、醣類、植物荷爾蒙(包括細胞分裂素、生長素、乙烯、離層酸、激勃素與 strigolactones)皆會扮演訊號傳遞者，經由木質部或韌皮部的運輸，引發局部性(local)或系統性(systemic)的缺磷反應(Abel, 2011; Chiou and Lin, 2011; Thibaud et al., 2010)。目前阿拉伯芥與水稻在缺磷誘導基因表達層次上的研究較多(Hammond et al., 2003; Misson et al., 2005; Wasaki et al., 2003; Wu et al., 2013)。在影響基因轉錄層次上，阿拉伯芥 PHR1 (PHOSPHATE STARVATION RESPONSE REGULATOR 1)，一個 R2R3 MYB 的轉錄因子及其 homolog 基因 PHL1 (PHR-LIKE 1)，藉由結合在 DNA 啟動子中一段命名 P1BS 的序列(GNATATNC)，是影響下游 PSR 基因轉錄表現的主要調控因子，而作用(Bustos

et al., 2010; Nilsson et al., 2007; Rubio et al., 2001)。在阿拉伯芥中亦發現，SIZ1 藉由 SUMO 蛋白質修飾化(sumoylation)調控 PHR 蛋白質，並改變後續 PSR 基因的表現(Miura et al., 2005)。其他轉錄因子如 MYB62、WRKY6、WRKY42、WRKY75、ZAT6 (zinc finger)皆參與調控缺磷下的反應機制，其中包括影響 Pi 在木質部內的裝載及運輸、或改變根部形態(Chen et al., 2009; Devaiah et al., 2007a, b; 2009)。

磷酸鹽轉運蛋白(phosphate transporter)為植物吸收、運移磷酸鹽的主要通道，其中，根據酵素動力學而分為高親和性(high-affinity)或低親和性(low-affinity)兩大家族(Raghothama and Karthikeyan, 2005)。在阿拉伯芥中將其磷轉運蛋白分為四大家族，分別為 PHT1、PHT2、PHT3 與 PHT4 (Poirier and Bucher, 2002)。其中 PHT1 家族內因序列相似性區分為 PHT1;1 至 PHT1;9，並且已實驗證實為細胞膜蛋白上的高親和性轉運蛋白，藉由消耗能量進行  $\text{Pi}/\text{H}^+$  共轉運功能，主要受缺磷誘導並表現在根部的表皮細胞與根毛(Mudge et al., 2002; Nussaume et al., 2011)。其中 PHT1;1 與 PHT1;4 在充足的磷環境下也能吸收磷，為重要的磷酸鹽轉運蛋白(Shin et al., 2004)。在 PHT1s 轉運蛋白在後轉譯修飾上，蛋白質 PHF1(PHOSPHATE TRANSPORTER TRAFFIC FACILITATOR1)則具有協助 PHT1s 從內質網運送至細胞膜的功能(González et al., 2005)；而泛素系統中 PHO2 (PHOSPHATE 2)與 NLA (NITROGEN LIMITATION ADAPTATION)，分別於高爾基體與細胞膜上調控 PHT1s 蛋白的降解(Huang et al., 2013; Liu et al., 2014)。PHO2 為一泛素接合酵素(ubiquitin E2 conjugase)，其後轉錄層次上受到微型核糖核酸 399 (miR399)調控，當阿拉伯芥於缺磷逆境下，會誘導 miR399 大量表現，並抑制目標基因 PHO2 的表達(Bari et al., 2006; Chiou et al., 2006)；而 NLA 為一 RING 型的泛素連接酵素(ubiquitin E3 ligase)，蛋白質 N 端具有 SPX domain 及 C 端具有 RING domain，於後轉錄層次上受到 miR827 調控(Lin et al., 2013b)。

磷酸鹽從根部自地上部之運輸，乃藉由表現於根部周鞘(pericycle)的 PHO1，以裝載磷酸鹽至木質部(xylem loading) (Hamburger et al., 2002)。然而，在磷充足環

境下時,PHO1 基因的表達分別於轉錄層次或後轉譯層次上,受到轉錄因子 WRKY6、WRKY42 或泛素接合酵素 PHO2 的抑制,以避免大量的 Pi 運送至地上部而過量累積(Chen et al., 2009; Liu et al., 2012)。



### 第三章 蝴蝶蘭於養分逆境下的生長反應



#### 摘要

氮、磷、鉀為植物生長與發育所必需的大量元素，為了瞭解蝴蝶蘭於不同養分逆境下的生長反應與缺乏徵狀，本試驗給予大白花蝴蝶蘭 *Phalaenopsis Sogo Yukidian* 'V3' 中苗不同濃度氮(0、0.71、7.14 mM)、磷(0、0.16、6.14 mM)、鉀(0、0.38、3.84 mM)的肥料，並栽種於控制日夜溫的人工氣候室下進行調查。當蝴蝶蘭栽種於 30/25 °C 的高溫環境下，缺肥處理 4 週、8 週及 12 週後，植株的生長量與外觀無差異；缺氮植株的 SPAD 值於處理 12 週後顯著下降，表示葉色偏黃，但無法用肉眼從植株外觀辨別。而植株栽種於 30/25 °C 下並維持於營養生長狀態，缺肥處理 32 週後，缺氮植株的 SPAD 值及鮮重下降，葉面積及葉片數減少，甚至有抽梗現象；缺磷植株的生長勢亦下降，並發生落葉；缺鉀植株則沒有任何徵狀。施肥處理 8 週後，將植株自 30/25 °C 移至 25/20 °C 的環境進行低溫催花 24 週，缺氮植株有顯著乾重降低、葉片變黃且提早抽梗現象，抽梗率 100%，但花朵數減少、變小且花梗縮短；缺磷植株的抽梗率低，落葉明顯且葉片呈紫色；缺鉀未影響植株的外觀及生長量，植株健壯，但造成抽梗延後。於營養生長下缺氮 12 週即造成蝴蝶蘭光合作用效率下降，然而缺鉀 32 週後，植株的光合作用能力仍不受影響；缺磷 32 週處理下雖不影響葉綠素螢光參數  $F_v/F_m$ ，但最大二氧化碳交換速率下降。蝴蝶蘭對於養分缺乏具有高耐受性，缺肥 12 週以前，植株無明顯徵狀，長期 32 週缺乏不同養分下，生理反應不一樣，若經過開花的植株其徵狀較維持於營養生長的植株明顯。

## 前言



蝴蝶蘭(*Phalaenopsis* spp.)為臺灣經濟花卉產業之旗艦作物，其外銷產值占臺灣國內蘭花作物的 69%，同時亦是最大宗的外銷花卉作物，蝴蝶蘭在 2012 年的外銷產值高達 113522 美金，主要出口至美國及日本(Lee, 2014)。蝴蝶蘭從育種、組培苗、小、中、大苗至開花株的生產皆可在不同地點進行，許多業者於國內外常透過合作以進行接力栽培，但每個業者的肥培管理與生產模式不盡相同。早期研究顯示，提高肥料濃度可促進植物生長速率(Wang, 1996; Wang and Gregg, 1994)，適當的氮、磷、鉀肥料之比例可有效降低生產時間及成本，在栽培期間中斷施肥，可能會影響後續的植株開花品質(Wang, 2000)。蝴蝶蘭可能具有貯藏肥料之能力，營養生長期間每個階段所施用之肥料可能都會影響到植株體內養分的分配及利用(Susilo and Chang, 2014; Susilo et al., 2014)，因此蝴蝶蘭對於無機養分的需求為一項值得深入探討及分析的課題。

氮、磷、鉀為植物生長及發育所必需之大量元素，農業栽培上常透過複合肥料供給作物，然而肥料施用已面臨過度使用、造成環境汙染或礦物資源耗盡的危機(Cordell et al., 2009; Yadav et al., 1997)。因此合理施肥為農產品栽培上重要的課題，並仰賴於植物對於各營養元素不同需求的認識與研究。

蘭科作物對於營養缺乏或毒害徵狀之呈現屬於緩慢性質(Hew and Yong, 2004)，通常當徵狀出現時，植株的生長勢已經很難恢復，導致商業品質降低。蝴蝶蘭於每個生長階段對養分的需求與耐受性也不一樣(陳，2014；游，2012；雷，2007)，且針對蝴蝶蘭於養分缺乏下的徵狀及生理機制相關研究少。大白花蝴蝶蘭 *Phal.* Sogo Yukidian 'V3' 在國際市場上廣受歡迎，本試驗針對此品種，分別給予不同程度缺乏之氮、磷、鉀濃度，觀察蝴蝶蘭在中苗栽培過程中，分別於營養生長或生殖生長期間下，短期缺肥與長期缺肥對植株的影響，調查蝴蝶蘭的外觀徵狀、生長勢及光合作用反應。

## 材料方法



### 試驗材料

由屏東科隆國際生物科技有限公司購入大白花蝴蝶蘭(*Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3') 5.3 公分(1.7 寸)盆小苗，植株選用的規格為，除了組培小葉外，均具 3 片葉長為 9-11 公分的完全展開葉及 1 片葉長為 6-8 公分的新生葉。試驗前除去原種植水苔，再以智利水苔種植植株於 8.5 公分(2.8 寸)加長型透明軟盆。水苔使用前以自來水浸泡隔夜兩次，並挑除水苔中枯枝落葉等雜質，再以脫水機脫水至微濕狀態，植株在換盆過程中，測量蝴蝶蘭小苗初始鮮重，並將地下部快速浸泡於稀釋 1000 倍的鋅錳乃浦 80%可濕性粉劑中，最後種植於 100 g 的水苔中。

### 試驗場所

植株栽培於中央研究院基因體研究中心的人工氣候室，為電腦調控日夜溫 30/25 °C 及 25/20 °C 的自然光照室，另搭設遮陰網以控制光度於 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  以下，平均濕度控制於 60%至 70%之間。試驗期間為 101 年 10 月至 102 年 8 月。

### 試驗設計

本試驗目的為施以不同濃度的氮肥、磷肥、鉀肥之肥料，探討蝴蝶蘭缺乏不同大量元素下之生理表現。總共分為 8 種不同肥料濃度處理：

1. +NPK：正常施肥之對照組，含 7.14 mM 氮、1.61 mM 磷及 3.84 mM 鉀
2. 0.1N：0.1 倍濃度的氮肥，含 0.71 mM 氮、1.61 mM 磷及 3.84 mM 鉀
3. 0N：不含氮肥，含 1.61 mM 磷及 3.84 mM 鉀
4. 0.1P：0.1 倍濃度的磷肥，含 7.14 mM 氮、0.16 mM 磷及 3.84 mM 鉀
5. 0P：不含磷肥，含 7.14 mM 氮、3.84 mM 鉀
6. 0.1K：0.1 倍濃度的鉀肥，含 7.14 mM 氮、1.61 mM 磷及 0.38 mM 鉀
7. 0K：不含鉀肥，含 7.14 mM 氮及 1.61 mM 磷
8. -NPK：缺乏氮、磷、鉀元素之負對照組



以上各肥料處理均含 1 mM 鎂、4 mM 鈣及微量元素，詳細配方於表 3.1，係參考雷(2007)之配方修正而得。



栽培管理為植株換盆後移至日夜溫 30/25 °C 人工氣候室，並給予恢復期兩個月，第一個月為根系恢復期，僅以一次水灌溉植株，第二個月為正常施肥期，以 +NPK 之肥料施肥兩次，每盆植株澆灌 100 mL 的肥料。當兩個月恢復期結束時，為了避免殘留太多 +NPK 肥料離子於介質水苔中，所有植株以大量一次水淋洗，於一日內分次(100 mL/次)澆灌共 1.3 L 的一次水，並隨機取 8 株植株以 pour-through 介質溶液測定方法(Yao et al., 2008)監測 EC 與 pH 值的變化(圖 3.1)，當澆灌共 1.3 L 的一次水後，平均 EC 值已從平均  $580 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  下降至  $20 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  以下，平均 pH 值回升至 5.25。接著開始施以不同肥料處理試驗，分為 +NPK、0.1N、0N、0.1P、0P、0.1K、0K、-NPK 共 8 種肥料處理。

試驗設計依照缺肥處理時間不同，分為以下兩部分：

### (1) 蝴蝶蘭於短期缺肥下的生長反應

此試驗目的為觀察蝴蝶蘭(*Phal. Sogo Yukidian* 'V3')在短期時間內，分別缺乏氮、磷、鉀元素對植株外觀及生長量的影響。上述植株於恢復期兩個月並以一次水淋洗後，以初始鮮重(植株購入時，脫盆後裸根的鮮重)平均隨機分布成 8 組，分別給予不同 +NPK、0.1N、0N、0.1P、0P、0.1K、0K、-NPK 之肥料，肥料皆於配置時調整 pH 值至 5.8，每次施肥前先以 200 mL 的一次水淋洗介質，稍微等待 5 分鐘後，淋洗液滴完但介質仍維持飽和溶液狀態下，每盆澆灌 100 mL 的肥料，平均 2 週施肥一次。植株栽培於日夜溫 30/25 °C 人工氣候室，放置一區域內採隨機分布。此試驗共分成 4 個試驗重複(experiment repeat)，每個試驗重複視為一個區集，而每個試驗重複下，各處理於不同取樣點皆 3 棵植株。分別於施肥處理後的 4、8、12 週取樣，進行植株的一般生長量調查。



## (2) 蝴蝶蘭於不同溫度下長期缺肥的生長反應

此試驗目的為觀察蝴蝶蘭(*Phal. Sogo Yukidian 'V3'*)長期缺乏氮、磷、鉀元素，並分別於營養生長期或生殖生長期下，對植株外觀、生長量及光合作用能力的影響。上述植株於恢復期兩個月並以一次水淋洗後，以初始鮮重平均隨機分布成 8 組，分別給予不同+NPK、0.1N、0N、0.1P、0P、0.1K、0K、-NPK 之肥料水，肥料皆於配置時調整 pH 值至 5.8，每次施肥前先以 200 mL 的一次水淋洗介質，稍微等待 5 分鐘後，淋洗液滴完但介質仍維持飽和溶液狀態下，每盆澆灌 100 mL 的肥料，平均 2 週施肥一次。植株栽培於日夜溫 30/25 °C 人工氣候室，開始施肥處理 8 週後，將植株分為兩組，一組維持在相同的日夜溫 30/25 °C 人工氣候室，另一組移至日夜溫 25/20 °C 人工氣候室，進行催花處理，放置於一區域內採隨機分布。此試驗共分成 3 個試驗重複(experiment repeat)，每個試驗重複視為一個區集，而每個試驗重複下，各處理於不同取樣點皆 3 棵植株。於施肥處理後的 32 週取樣，進行植株的一般生長量調查、開花表現調查。另外在栽培過程中，分別於 1、2、7、12、24、32 週測量淨光合作用速率、葉綠素螢光。

## 調查項目及方法

### 一、一般生理調查

1. 總葉片數(total leaf number)：計算植株上總葉片數，包括未完全展開之新生葉片。
2. 葉長(leaf length)：測量葉片基部葉痕處至葉尖的長度。
3. 葉寬(leaf width)：測量葉片自然展開下最寬的長度。
4. 葉面積(leaf area)：分別調查植株各葉片長度及寬度，再以葉面積估算公式(林和李，1988)估算，葉面積=葉長 x 葉寬 x 0.7221。
5. 到抽梗天數(days to spiking)：花梗抽出後達 1 cm 視為抽梗，計算由低溫催花處理後至此階段所需天數。

- 
6. 到花天數(days to flowering)：第一朵花花瓣完全展開視為花開，計算由低溫催花處理後至此階段所需天數。
  7. 花梗長(stalk length)：測量花梗基部至花梗頂端之長度。
  8. 花梗直徑(stalk width)：測量花梗上第一節位的直徑。
  9. 花徑(flower diameter)：測量第一朵花自然展開時兩片翼瓣的直徑。
  10. 總花朵數(total flower number)：計算植株上總花朵數，包括未開放之花苞。
  11. 鮮重(fresh weight)：初始換盆與最後取樣時，將植株洗淨晾乾後分別秤取植株地上部、地下部與總重量。
  12. 乾重(dry weight)：取樣後，將植株洗淨，於 65-70 °C 烘箱中烘乾 3 天，直至植株完全乾燥後秤重。
  13. 葉綠素計讀值(SPAD-value)：以葉綠素計(SPAD-502, Minolta Camera Co., Tokyo, Japan)測量第一片成熟葉(由上往下數第一片完全展開葉)葉片前、中、後之葉色平均值。

## 二、淨光合作用速率測定

蝴蝶蘭為 CAM 光合作用型植物，為了測量淨光合作用速率的變化，因此於晚上利用可攜式光合作用測定儀(LI-6400XT portable photosynthesis system, LI-COR, Lincoln, NE, USA)測量葉片的 CO<sub>2</sub> 交換速率。測量方式為一開始先進行機器的流速零點校正及葉箱(6400-08 clear chamber bottom, LI-COR Inc.)的零點及滿點校正，並利用乾燥劑(Blue-Indicating Drierite, W.A. Hammond Drierite Co. Ltd, Xenia, OH, USA)及蘇打石灰(Soda lime, LI-COR Inc.)吸收進入迴路之水氣及二氧化碳，控制葉箱中流速(flow)為 500  $\mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$ ，固定給予 350 ppm 二氧化碳，氣孔指數設為 1，測量面積為 6 cm<sup>2</sup>。將葉箱夾上葉片，等待數值穩定後開始記錄淨二氧化碳交換速率(Net CO<sub>2</sub> uptake rate)，每秒紀錄 1 次，紀錄 3 次後取平均值。本試驗受測量之葉片

皆為植株當時的第一片成熟葉(由上往下數第一片完全展開葉)，測量時間為晚上九時至凌晨十二時。



### 三、葉片葉綠素螢光測定

利用可攜式葉綠素螢光測定儀(Chlorophyll fluorometer, MINI-PAM, WALZ, Effeltrich, Germany)測量植株當時的第一片成熟葉，測量時間於早上十一時至下午二時，測量之前先以葉夾夾住葉片進行暗馴化 30 分鐘，再以飽和脈衝光(saturating pulse)照射植株葉片測量葉綠素螢光釋放量，分析光系統 II 最大光子利用效率(Maximum quantum efficiency of photosystem II photochemistry,  $F_v/F_m$ )。

### 四、EC 及 pH 值之量測

以 pH 及 EC 儀(IQ170, IQ Scientific instruments, Carlsbad, CA, USA) 校正後使用。pH 計分別於 pH 10、7 及 4 進行三點校正，EC 計則於  $1 \text{ dS} \cdot \text{m}^{-1}$  進行一點校正。主要利用於配置肥料時之量測。

### 生物統計分析

本試驗數據採隨機完全區集設計(Randomized complete block design, RCBD)分析，每一個試驗重複(experiment repeat)視為一個區集(blocking)。資料以 COSTAT 6.2 (CoHort Software, CA, USA)統計軟體，進行變方分析(ANOVA)及最小顯著差異分析(Least significant difference, LSD)，分析各處理間  $P \leq 0.05$  有無顯著性差異。以 SigmaPlot 10.0 (Systat software INC., Richmond, Calif., USA)為本試驗繪圖程式。

## 結果



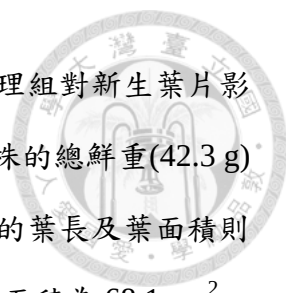
本試驗為觀察蝴蝶蘭在缺乏不同濃度的氮、磷、鉀下的生長反應與缺肥外觀徵狀，並分成短期(4、8、12 週)及長期(32 週)不同溫度下兩部分進行討論：

### 一、蝴蝶蘭於短期缺肥下的生長反應

蝴蝶蘭在缺乏不同濃度的氮、磷、鉀處理 4 週後，具有 4.8-5.2 片葉片，不論是總葉長、總葉面積或者是第一片成熟葉的葉長、葉面積在不同處理下皆無差異，第一片成熟葉的 SPAD 值平均為 56.9(表 3.2)，葉色濃綠。植株外觀及大小上亦無任何差異(圖 3.2A)。而缺肥 4 週後，植株的鮮重及乾重上於各處理間無顯著差異(表 3.3)，顯示蝴蝶蘭缺乏不同濃度的氮、磷、鉀肥料 4 週後，在植株的生長上不會造成差異。

缺肥處理 8 週後，植株在葉片數及總葉長上無差異，但對照組+NPK 具最高的葉片數 6.0 片及總葉長 50.0 cm (表 3.4)。第一片成熟葉在處理 8 週後，缺磷 0.1P 處理的植株葉長為 15.2 cm，葉面積為 63.9 cm<sup>2</sup>，皆為各處理間最高，缺磷 0P 及對照組+NPK 次之，缺氮及缺鉀處理下第一片成熟葉的葉長及葉面積較小，顯示蝴蝶蘭缺磷 8 週，不會影響葉片生長；而對照組-NPK 在同時缺乏氮、磷、鉀 8 週後，明顯地造成第一片成熟葉的葉長及葉面積減小，葉長僅有 13.1 cm，葉面積為 49.9 cm<sup>2</sup>(表 3.4)。但各處理的植株外觀大小上，皆看不出差異(圖 3.2B)，第一片成熟葉的 SPAD 值在各處理間也無差異(表 3.4)。比較處理 8 週後植株重量上的差異，各處理間的總鮮重及總乾重皆無差異，以負對照組-NPK 的地上部鮮重為 23.3 g，地上部乾重為 1.2 g(表 3.5)，其葉片重量明顯低於其他處理組。

養分缺乏處理 12 週後，蝴蝶蘭的總葉片數於各處理間無差異，具有 5.2-5.6 片葉片。在植株葉片生長與鮮重方面，以 LSD 方法分析缺氮、缺磷、缺鉀處理間的差異，6 組處理(0.1N、0N、0.1P、0P、0.1K 及 0K)間無顯著差異。其中，缺氮



0.1N 及 0N 處理的植株總葉長及葉面積較小，尤其以缺氮 0N 處理組對新生葉片影響較明顯，第一片成熟葉葉長僅 13.9 cm，葉面積 59.1 cm<sup>2</sup>，植株的總鮮重(42.3 g)也降低(表 3.6、3.7)。缺磷 0.1P 及 0P 處理的植株第一片成熟葉的葉長及葉面積則未受到缺磷處理影響，0P 處理的第一片成熟葉葉長為 15.6 cm，葉面積為 68.1 cm<sup>2</sup>，為所有處理組中最高，缺磷 0.1P 及 0P 處理植株的總鮮重及總乾重皆高於對照組 +NPK，顯示缺磷 12 週後並未造成植株生長量下降(表 3.6、3.7)。缺鉀 0.1K 及 0K 處理 12 週後則造成植株第一片成熟葉的葉長、葉面積及總鮮重下降(表 3.6、3.7)。而負對照組-NPK 處理的植株，總葉片數、總葉片長及總葉面積皆為各處理組中最低，第一片成熟葉的葉長僅 13.2 cm，葉面積僅 51.1 cm<sup>2</sup>，表示葉片的生長在缺乏氮、磷、鉀三大元素下明顯地受到抑制，植株總鮮重 40.5 g，為各處理組中最低(表 3.6、3.7)。

蝴蝶蘭缺肥 12 週後，總乾重平均介於 2.7-3.0 g (表 3.7)，以 ANOVA 分析各處理間的植株總乾重，亦無差異( $P$  value = 0.1541)，且地下部乾重也無受到缺肥處理的影響，平均介於 1.4-1.5 g。但地上部乾重的累積，以缺鉀 0K 及負對照組-NPK 處理組最低，地上部僅 1.3 g (表 3.7)。另外，缺肥處理 12 週後，以葉綠素計測量葉色，缺氮 0.1N、0N 及負對照組-NPK 處理組的 SPAD 值最低，代表葉片偏黃；缺鉀 0.1K 及 0K 處理組的 SPAD 值最高，顯示葉色濃綠(表 3.6)。但觀察植株的外觀、葉色及大小，未見養分缺乏徵狀(圖 3.2C)，蝴蝶蘭缺乏不同濃度的氮、磷、鉀元素 12 週後，用肉眼仍無法直接判斷出植株的缺肥狀況。

## 二、蝴蝶蘭於長期缺肥下的生長反應

當蝴蝶蘭栽培於日夜溫 30/25 °C 的人候室中，以環境控制植株維持於營養生長的狀態，缺乏不同濃度的氮、磷、鉀肥料處理 32 週後，植株不會因此而凋萎、死亡(圖 3.3)。但從外觀及大小看，可看到缺氮會造成植株相較於正對照組生長量變小，葉色稍微變淺綠(圖 3.3A)，SPAD 值只有 35.2-37.2，為所有處理組中最低(表

3.8)；缺磷不會影響外觀植株大小，但葉片變紫，以缺磷 0P 組更為明顯；而缺鉀 32 週後，植株在營養生長下外觀幾乎沒有受到影響，葉片大小與對照組+NPK 沒有差異，葉色濃綠，SPAD 值最高(表 3.8)，且無缺鉀病徵；而負對照組於同時缺乏氮、磷、鉀 32 週後，植株明顯變小(圖 3.3A)。

由表 3.8 看植株葉片生長量的變化，植株於營養生長下缺乏養分 32 週後，缺鉀不會造成葉片數減少，缺鉀 0.1K、0K 組與對照組+NPK 皆有 4.1-4.3 片葉；而缺氮、缺磷會造成有落葉現象，0N 組及 0P 組只有 2.6 片葉，-NPK 組只有 2.4 片葉。而葉片生長部分，缺鉀 0.1K、0K 組與對照組+NPK 的總葉長、總葉面積、第一片成熟葉的葉長與葉面積皆沒有差異，顯示缺鉀不會影響葉片的生長；缺氮則會造成葉片的生長下降，0N 組受缺氮的處理影響較 0.1N 組更嚴重，總葉長僅 31.7 cm，第一片成熟葉的葉長 13.1 cm 及葉面積 51.8 cm<sup>2</sup>，顯示長期缺氮會造成葉片生長量下降且葉片變小；而 0.1P 組與 0P 組的第一片成熟葉長分別有 15.9 cm 及 14.9 cm，與缺鉀 0.1K 及+NPK 正對照組沒有顯著差異，顯示缺磷不會影響到新生葉片在缺肥過程中的生長，但因為缺磷會造成落葉，使葉片數下降，因此使總葉面積減少，0P 處理的總葉面積僅 142.9 cm<sup>2</sup>。而-NPK 負對照組在同時缺乏氮、磷、鉀三大元素 32 週後，總葉長、總葉面積皆為最小，總葉面積僅 107.6 cm<sup>2</sup>(表 3.8)。

長期 32 週的養分缺乏對營養生長下植株重量的影響方面，對照組+NPK 有最高的鮮重，植株平均 74.9 g；缺鉀會造成鮮重略低於正對照組；缺氮與對照組-NPK 的鮮重顯著下降，對照組-NPK 的鮮重僅有 48.9 g。無論是氮、磷、鉀處理組，完全不給予(0N、0P、0K 組)元素處理下植株的鮮重皆低於給予 0.1 倍氮、磷、鉀處理組(0.1N、0.1P、0.1K 組)(表 3.9)。但各組的總乾重沒有顯著差異( $P$  value = 0.0729)，介於 4.72-5.55 g，地下部乾重也沒有差異( $P$  value = 0.0797)，介於 2.76-3.42 g，缺氮植株的地上部乾重低於缺磷、鉀植株，顯示缺肥處理會先影響到地上部乾重的累積(表 3.9)。

另外，蝴蝶蘭栽培於 30/25 °C 的人工氣候室下，以不同濃度的氮、磷、鉀處理 32 週後，儘管沒有低溫處理，缺氮 0.1N、0N 組及負對照組-NPK 組皆會造成蝴蝶蘭有抽梗現象，以 0.1N 及-NPK 處理下抽梗率最高，抽梗率達 56% (表 3.8)，但於 32 週收取植株樣本時花梗上還未出現第一朵花苞。

為探討長期養分缺乏對生殖生長下的蝴蝶蘭之影響，因此，自處理進行 8 週後，部分植株從 30/25 °C 的人工氣候室移至 25/20 °C 的人工氣候室，利用低溫處理促進蝴蝶蘭抽梗開花，並同樣處理不同濃度的氮、磷、鉀缺乏 32 週。結果顯示，由外觀形態上觀察，缺氮處理相對於對照組+NPK，植株較小且葉色明顯變黃(圖 3.3B)，花梗較短且花數少(圖 3.4B、F)，而缺磷會造成植株葉色明顯呈現暗紫色(圖 3.3B)，並且造成部分植株不抽梗(圖 3.4C、G)。且在缺磷 0P 處理組中，植株葉片數明顯地變少(圖 3.4G)，缺鉀的植株即使在開花後，植株仍然維持健壯、葉色濃綠，與對照組+NPK 外觀相較下無差異(圖 3.3B)，但觀察缺鉀植株的開花表現，可觀察到未開放的花苞，抽梗與開花時間較晚(圖 3.4D、H)，而對照組-NPK 的植株相較於其他植株皆明顯地較小、葉色變淡(圖 3.3B)，花梗變短、花數減少(圖 3.4E)。而以葉綠素計讀值來看，缺磷、缺鉀處理的植株 SPAD 值平均高於對照組+NPK，缺氮處理的植株 SPAD 值最低，0.1N 及 0N 組的 SPAD 值分別為 29.5 及 31.2 (表 3.10)。

比較不同濃度氮、磷、鉀對植株葉片生長的影響，缺鉀 0.1K 及 0K 組的植株在總葉數、總葉長、總葉面積、第一片成熟葉的葉長及葉面積上皆與對照組+NPK 無差異，0.1K 及 0K 組植株的總葉數分別為 4.8 及 4.6 片，總葉長分別為 54.1 及 53.3 cm；而缺磷處理下，植株第一片成熟葉的葉長及葉面積均高於其他處理，0.1P 組的第一片成熟葉的葉長及葉面積分別為 14.9 cm 及 63 cm<sup>2</sup>，但缺磷會造成蝴蝶蘭落葉，平均只有 3.2-3.3 葉，因此其總葉長及總葉面積僅次於對照組+NPK 及缺鉀處理組的植株；缺氮則造成蝴蝶蘭植株生長勢明顯變差，主要影響其葉片的生長，總葉長、總葉面積、第一片成熟的葉長與葉面積皆顯著下降，完全缺氮 0N 處理的植株葉片生長量更小於 0.1N 處理的植株，相較於對照組+NPK 的第一片成熟葉葉



長與葉面積(15.0 cm 及 62.4 cm<sup>2</sup>), 0N 處理組的第一片成熟葉僅 11.5 cm 及 41.9 cm<sup>2</sup>; 所有處理中, -NPK 負對照組的總葉數、總葉長、總葉面積、第一片成熟葉的葉長及葉面積皆為所有處理中最低, 總葉面積只有 125.1 cm<sup>2</sup>(表 3.10)。

而對於經低溫誘導開花後的植株, 不同濃度氮、磷、鉀的處理對於其地上部、地下部、花梗、花朵的鮮重與乾重影響的結果是, 對照組+NPK 的總鮮重與總乾重皆為最高, 分別為 88.5 g 及 6.5 g, 且花梗與花朵的鮮重、乾重皆顯著高於其他處理, 花梗與花朵的鮮重分別為 7.0 g 和 21.4 g (表 3.11), 與其花梗長度、直徑、花朵數、花徑皆大於其他處理組有關(表 3.12)。缺鉀 0.1K 組的植株在總鮮重及總乾重上與對照組+NPK 無顯著差異, 0K 組則在植株總乾重上略低於+NPK 正對照組。缺磷處理的總鮮重與總乾重次於缺鉀, 缺氮及對照組-NPK 最低, 0N 及-NPK 組的總乾重僅有 4.7 g, 因地上部、地下部、花梗的乾重皆低於其他處理。而花朵的乾重除了在對照組+NPK 下高達 1.11 g, 於缺氮、磷、鉀處理之間皆無差異(表 3.11)。

開花表現上, 養分缺乏處理於花梗長度與花梗直徑之間未造成差異, 但缺氮處理下平均花梗長度低於對照組+NPK (41.3 cm), 僅 32.2-34.2 cm (表 3.12), 植株明顯較矮(圖 3.4), 對照組-NPK 的花梗直徑則最低(表 3.12), 花梗明顯最細。缺乏氮、磷、鉀皆會造成花朵數降低, 尤以缺氮處理下的花朵數最少。花朵大小在缺乏氮、磷、鉀之間無差異, 皆小於對照組+NPK (花徑 11.5 cm) (表 3.12)。另外, 植株置於低溫 25/20 °C 環境 24 週後, 各處理+NPK、0.1N、0N、0.1P、0P、0.1K、0K、-NPK 的抽梗率分別為 78%、100%、100%、11%、44%、67%、44%與 100%, 顯示缺氮及全缺處理(-NPK)會促進抽梗, 抽梗率皆 100%, 且有提早抽梗現象, 0.1N、0N 及-NPK 處理植株分別在低溫後 36、37 和 28 天開始抽梗, 相較於對照組+NPK 為低溫後 42 天; 缺磷有抑制植株抽梗現象, 0.1P 處理組的抽梗率僅 11%; 缺鉀則明顯延後抽梗時間, 0.1K 與 0K 的植株分別於低溫後 71、79 天才開始抽梗(圖 3.5)。各種養分缺乏處理對開花表現的影響之趨勢與抽梗相似, 各處理+NPK、0.1N、0N、0.1P、0P、0.1K、0K、-NPK 的開花率分別為 78%、100%、100%、11%、44%、

56%、33%與 100% (圖 3.6)。

本試驗中，除測量與紀錄蝴蝶蘭於養分缺乏下的生長量與徵狀外，分別於試驗過程中測量植株光合作用中淨二氧化碳交換速率及光系統 II (Photosystem II, PS II) 最大光子利用效率( $F_v/F_m$ )的變化。分別於植株在營養生長(置於 30/25 °C 環境)下缺乏不同元素 1(或 2)、7、12、25、32 週後(淨二氧化碳交換速率及光系統 II 最大光子利用效率( $F_v/F_m$ )於第一次測量時，分別於第 1 週和第 2 週進行)，及植株於在生殖生長(後期移置於 25/20 °C 環境)下缺乏不同元素 25、32 週後測量。結果顯示，淨二氧化碳交換速率與  $F_v/F_m$  於養分缺乏 1(或 2)、7 週後於各處理間皆無差異。第 12 週後， $F_v/F_m$  值於各處理間有差異，其中缺氮 0.1N 及 0N 處理的植株其淨二氧化碳交換速率與  $F_v/F_m$  平均值皆最低(表 3.13、3.14)，顯示蝴蝶蘭於缺乏氮肥 12 週後，外表雖然沒有明顯的徵狀(圖 3.2C)，但光合作用效率已受到抑制。後期養分缺乏處理 25、32 週後，缺鉀植株的淨二氧化碳交換速率與  $F_v/F_m$  值與對照組+NPK 比較下沒有差異。30/25 °C 下缺鉀 32 週後，其淨二氧化碳交換速率仍有  $2.75 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ， $F_v/F_m$  平均值為 0.82，其值與正常栽培下健康植株相近，顯示 32 週長時間缺乏鉀，不會影響到蝴蝶蘭光合作用系統。但栽培於 25/20 °C 下的植株其值則低於栽培於 30/25 °C 下的植株，可能受低溫降低光合作用效率有關。蝴蝶蘭於長期(25-32 週)缺乏氮肥(0.1N 和 0N 處理)後，其  $F_v/F_m$  值顯著地下降，在 30/25 °C 下的植株其  $F_v/F_m$  值僅 0.76，在 25/20 °C 下經誘導開花的植株  $F_v/F_m$  值僅 0.71，顯示 PS II 系統因缺氮而受到抑制。而開花的植株因花朵與花梗為主要的積貯，葉片分配到的氮肥更少，使  $F_v/F_m$  值更低，並影響 0N 處理下開花的植株其淨二氧化碳交換速率僅有  $1.11 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。而蝴蝶蘭在 30/25 °C 或 25/20 °C 環境下缺磷(0.1P 和 0P 處理)32 週後，其  $F_v/F_m$  值分別為 0.79 與 0.77，與對照組+NPK 之  $F_v/F_m$  值無顯著差異，但 0P 處理的植株於缺磷 25、32 週，其淨二氧化碳交換速率大部分皆顯著低於對照組+NPK (表 3.13、3.14)。

## 討論



蘭科作物對於肥料缺乏具有極高的耐受性，香莢蘭 *Vanilla* 在缺肥 3 週和蝴蝶蘭 *Phalaenopsis* 在缺肥 5 個月以前，皆沒有明顯的缺肥徵狀(Cibes et al., 1947; Yoneda et al., 1997)。相較於其他作物，蝴蝶蘭在栽培過程中遭遇逆境時難以從外觀徵狀判斷，且蝴蝶蘭具有肥厚的葉片及根部，其組織可能具有貯藏養分之能力，在不同的生長階段，反應缺肥的徵狀程度也不一樣，因此蝴蝶蘭在養分逆境下的生理反應為一值得觀察與研究的主題。

本試驗的目的為給予蝴蝶蘭 *Phal. Sogo Yukidian* 'V3' 在中苗栽培期間不同濃度的氮、磷、鉀肥，並分別置於不同溫度環境而控制植株維持營養生長或促進生殖生長，期望瞭解蝴蝶蘭分別於氮、磷、鉀缺乏逆境下的反應及徵狀。

### 一、缺乏氮、磷、鉀對蝴蝶蘭生長的影响

#### 1. 蝴蝶蘭於缺氮下之生長反應與徵狀

氮為組成生物體內重要有機物的元素，例如胺基酸、核酸、蛋白質等，為生物生長所需的重要元素(Maathuis, 2009; Taiz and Zeiger, 2010)。當一般作物缺氮時，會顯著地影響光合作用效率、葉片中葉綠體數目減少、地上部生長受到抑制、最後植株的乾重累積下降，導致生長不良及生產量下降(Bondada and Syvertsen, 2005; Guidi et al., 1997; Nevins and Loomis, 1970; Zhao et al., 2005)。缺氮對葉綠體造成的影響，除葉片中葉綠體變小與數目變少，缺氮會造成葉片氣孔(stroma)減少、色素體(plastid)發育不完全、基粒(grana)腫脹且數量減少、葉綠體內累積大量的澱粉(Bondada and Syvertsen, 2005; Hall et al., 1972; Thomson and Weier, 1962)。而氮為易移動性元素，因此大多數植物缺氮環境下，常於下位葉發現黃化情形(Johnson, 1973; Vesik et al., 1966)



本試驗中，氮顯著地影響蝴蝶蘭 *Phal. Sogo Yukidian* ‘V3’ 的生長、開花表現與外觀，且相較於磷、鉀，缺氮的徵狀最早出現。在缺氮處理 8 週後，葉片生長勢下降，第一片成熟葉小於對照組+NPK (表 3.4)。缺氮處理 12 週後，植株的總葉片面積、長度皆顯著減少(表 3.6)，0N 處理的植株鮮重明顯下降(表 3.7)，顯示完全缺氮的影響更甚於低氮 0.1N 處理的植株；另外，缺氮植株之 SPAD 值下降，但外觀上與對照組或其他處理組無差異(表 3.6、圖 3.2)。當缺氮處理 32 週後，蝴蝶蘭植株的生長勢明顯地變弱，其葉數、葉面積、葉長、鮮重、乾重皆低於其他肥料處理(表 3.8-3.11)，外觀上明顯弱小，葉色轉為淺黃(圖 3.3)。缺氮對蝴蝶蘭開花表現之影響，會造成蝴蝶蘭之花梗變短、變細，且顯著地降低花朵數及花徑，完全缺氮 0N 處理之植株僅 3 朵花(表 3.12)，花梗與花朵之鮮重、乾重皆降低(表 3.11)。缺氮亦造成蝴蝶蘭抽梗及開花日期提早、抽梗率及開花率均達 100% (圖 3.5、3.6)，但是缺氮植株外觀營養不良、花朵少且小(圖 3.4B、F)。

本試驗中，蝴蝶蘭 *Phal. Sogo Yukidian* ‘V3’ 缺氮之生長反應及徵狀與游(2012)的結果相符。蝴蝶蘭(*Phal. Musashino* ‘90’ × *Phal. Hakalau Queen* ‘America’) 在缺氮環境下 5 個月，會降低完全展開葉片之葉數及大小，造成落葉增加，導致總葉面積降低，且葉綠素的濃度降低，植株乾重下降(Yoneda et al., 1997)。其他蘭科作物如臺灣一葉蘭、石斛蘭、香草蘭、齒舌蘭遭遇缺氮逆境時，外觀皆明顯地生長不良，發生黃葉、落葉、植體鮮乾重下降、花朵數減少等現象(宋，1986；郭，1984；Bichsel et al., 2008; Cibes et al., 1947; Yoneda et al., 1999)，顯示氮肥對於蘭科植物的植株生長、花朵發育皆相當重要，缺乏氮肥可能會嚴重地導致蘭花生長勢降低、減緩，並使開花表現變差。

另外，磷鉀肥雖然對於蝴蝶蘭促進生殖生長有益，但氮肥在開花階段的供給也很重要。Wang(2000)於蝴蝶蘭生殖期以不同頻率之低氮高磷鉀肥研究其對開花的影響，結果顯示，以高磷鉀肥處理者，不管施肥頻率如何，不會影響抽梗、開花日期及花朵大小和壽命，反而降低總花數。相較之下，對照組穩定地供給足夠

的氮肥，花朵較大且花朵壽命較長，表示對蝴蝶蘭開花而言，施用足夠的氮肥比提高磷肥重要。蝴蝶蘭抽梗後若停止施肥，雖不會影響抽梗日期及花朵大小，但會降低開花數並限制新葉生長(Wang, 2000)。而在蝴蝶蘭栽培期間，施以較高濃度的氮肥，可使其生長速度較快，增加葉面積及鮮重(Wang, 1996)。

綜合上述現象，氮肥直接地影響植物的生長與發育，顯示氮為蝴蝶蘭栽培過程中不可供應不足的元素，然而，蝴蝶蘭對於養分缺乏具有極高的耐受性，於缺氮 12 週前仍無法由外觀分辨，因此要非常注意。

## 2. 蝴蝶蘭於缺磷下之生長反應與徵狀

磷是植物細胞內重要化合物的組成元素，包括 DNA、RNA、ATP 等，並參與光合作用和呼吸作用以中間產物傳遞能量，構成組成細胞膜的磷脂等(Maathuis, 2009; Taiz and Zeiger, 2010)。植物在缺磷會抑制葉片創始及發育，細胞分裂受阻，導致葉片生長受到抑制，最顯著地影響在葉面積減少，造成地上部的乾重累積下降(Chiera et al., 2002; Fredeen et al., 1989; Lynch et al., 1991; Radin and Eidenbock, 1984)。本試驗中，蝴蝶蘭 *Phal. Sogo Yukidian* 'V3' 中苗缺磷 12 週前，由外觀與生長量皆看不出缺乏磷肥對於植株的影響(表 3.2-3.7、圖 3.2)，可能在此試驗前期，植株體內的磷足夠植物生長及發育；當植株缺磷 32 週後，無論處於營養生長或生殖生長期，植株生長勢均受抑制，雖然缺磷影響生長勢的情形不如缺氮嚴重，但植株鮮重及乾重降低、葉片總面積顯著下降(表 3.8-3.11)。

游(2012)的研究顯示蝴蝶蘭新葉生長速度於缺磷 8 週後有開始減緩現象。然而本試驗中，第一片成熟葉之葉長及葉面積僅略低於+NPK 對照組(表 3.8、3.10)，不像缺氮之第一片成熟葉顯著小於對照組，因此推測缺磷過程中發育的葉片(第一片成熟葉)，未受到低磷濃度影響而抑制葉片生長，但缺磷的植株則明顯不再長出新葉(資料未顯示)。另外，因為蝴蝶蘭本身生長緩慢，植株總葉面積下降的主要原因為下位葉黃化、接著落葉情形相對嚴重。其他蝴蝶蘭的缺磷研究中，同樣地觀察



到葉片數減少、落葉情形(游, 2012; Yoneda et al., 1997)。文獻指出, 許多植物具有自老葉、即將掉落的黃葉中回收磷的能力(Herrera et al., 1978; Zotz, 2004), 此現象可能與蝴蝶蘭於缺磷下的落葉相關, 但仍需進一步驗證。

植物在缺磷逆境下的常見徵狀, 包括植物體內開始出現花青素合成相關的基因表現、接著花青素累積於地上部組織(Hammond et al., 2004; Hermans et al., 2006; Lawanson et al., 1972)。本試驗中, 蝴蝶蘭於缺磷 12 週後, 葉色濃綠(圖 3.2), 缺磷 32 週後, SPAD 值與對照組仍無顯著差異, 但葉色明顯變紫(圖 3.3), 且開花後之植株其葉片深紫色現象較未開花之植株嚴重。其他研究中, 缺磷造成蝴蝶蘭老葉變紫紅(游, 2012; Yoneda et al., 1997)。花青素的累積, 可能是為了保護處於營養逆境下的植物, 避免紫外光傷害細胞內遺傳物質及免於葉綠體遭受光抑制(Chalker-Scott, 1999; Hoch et al., 2001)。

缺磷對於抑制開花表現的前人研究少, 三葉草(*Trifolium subterraneum* L.)在環境急性缺磷下, 花朵創始會延遲(Rossiter, 1978); 番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)缺磷 10 天後, 花朵數下降(Menary and Staden, 1976)。在蝴蝶蘭開花表現上, 缺磷會抑制蝴蝶蘭的生殖生長, 抽梗率下降且花朵數減少(游, 2012; Yoneda et al., 1997)。本試驗中, 0.1P 缺磷處理的植株抽梗率僅 11%(圖 3.5), 而 0P 處理之抽梗率高於 0.1P 處理的原因, 可能與植株本身營養歧異有關; 花朵也受缺磷影響而導致花數較少、花朵較小(表 3.12)。蝴蝶蘭(*Phal.* Musashino '90' × *Phal.* Hakalau Queen 'America')在缺磷環境下 5 個月, 抽梗率僅 4% (Yoneda et al., 1997)。

### 3. 蝴蝶蘭於缺鉀下之生長反應與徵狀

鉀參與維持細胞滲透勢、氣孔運動、蛋白質合成與碳水化合物代謝等生理代謝過程(Maathuis, 2009; Taiz and Zeiger, 2010)。本試驗中, 缺鉀處理的植株無論於缺鉀 8、12、32 週後, 於外觀上幾乎看不出有任何缺鉀的徵狀(圖 3.2、3.3), 生長勢與+NPK 對照組相似, 儘管缺鉀 32 週後, 無論於營養生長下或經低溫誘導抽梗

後，其葉數、總葉長與葉面積、植株鮮重與乾重，相較+NPK 對照組皆無顯著差異(表 3.8-3.11)。在其他試驗中，也顯示缺鉀不會對蝴蝶蘭葉片或根部的生長勢造成影響，植株的總乾重或葉面積與對照組皆無差異(游，2012; Yoneda et al., 1997)。然而，當施予不同濃度的鉀肥於蝴蝶蘭(*Phal. Taisuco Kochdian*)大苗，雖不會影響新生葉片數，但鉀肥濃度越高，新葉之葉長與葉寬越大(Wang, 2007)。

許多前人研究指出，鉀肥會影響蝴蝶蘭後續開花表現(游，2012; 雷，2007; Wang, 2007)。在本試驗中，缺鉀處理唯一與+NPK 對照組不同的徵狀為，蝴蝶蘭抽梗與開花時間延後，0.1K 及 0K 處理之植株相較於對照組分別延後 29、37 天才抽梗(圖 3.5)，於試驗結束取樣時，有些花朵尚未完全開放(圖 3.4D、H)，其花梗鮮重、花梗長及花朵數與對照組無差異，但花朵數較少(表 3.11、3.12)。然而，其他試驗中，蝴蝶蘭對於缺鉀反應，如抽梗與開花時間與上述不一致，蝴蝶蘭(*Phal. Musashino '90'* × *Phal. Hakalau Queen 'America'*)大苗於缺鉀 5 個月後提早抽梗(Yoneda et al., 1997)，蝴蝶蘭 *Phal. Taisuco Kochdian* 與 *Phal. amabilis* 大苗的抽梗與開花時間不受鉀肥濃度影響(雷，2007; Wang, 2007)。蝴蝶蘭 *Phal. Sogo Yukidian 'V3'* 則在游(2012)的試驗中，低鉀 0.1K 處理的植株抽梗時間與對照組相似，但缺鉀 0K 處理的植株延後抽梗。

另外，文獻指出，蝴蝶蘭於生殖生長期間，花梗與花朵之發育會需要大量的鉀(黃，1994)。蝴蝶蘭 *Phal. amabilis* 和 *Phal. Sogo Yukidian 'V3'* 於抽梗及開花階段，花梗與花朵中的鉀濃度與含量皆較其他元素高，下位葉之鉀含量則顯著下降(雷，2007)。蝴蝶蘭 *Phal. Sogo Yukidian 'V3'* 於鉀肥 0 mM 處理下，花梗與花朵內的鉀元素仍佔了總植株的 49%與 22% (游，2012)。調查生殖生長期間發生黃斑之蝴蝶蘭，結果黃化葉片中鉀濃度顯著較其他正常植株低，顯示葉片黃化與缺鉀相關(陳，2001)。當蝴蝶蘭 *Phal. Taisuco Kochdian* 種植於樹皮下，施予小於 50 mg·L<sup>-1</sup> 的鉀肥會造成植株在開花期間，下位葉片發生黃化、紫斑、壞疽現象，自葉尖、葉緣開始發生，且於開花過程越來越嚴重，甚至於開花後植株死亡；而種植於水苔下的

植株，於完全缺鉀處理( $0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )下不開花(Wang, 2007)。鉀為易移動性之元素，缺鉀之蝴蝶蘭葉片黃化現象通常發生在下位葉(陳，2001; Wang, 2007)。然而，在游(2012)試驗中，*Phal. Sogo Yukidian* ‘V3’則於上位葉發生葉片黃化、壞疽現象。根據雷(2007)調查缺鉀植株各器官的元素含量，發現花梗於抽出階段，上位葉鉀濃度會下降，下位葉鉀濃度增加，可能與花梗為主要積貯，鉀肥由上位葉運移至下位葉供底部抽梗所需，因此缺鉀也可能發生上位葉黃化之現象。在本試驗中，在缺鉀植株中沒有發現任何葉片黃化(圖 3.3B)，可能因為在本試驗中，所有植株於換盆後仍給予一個月的正常施肥，因此使植株體內貯存的鉀是足夠的，並足以蓄積到試驗開始約四個月後供花梗與花朵發育。

鉀肥於蝴蝶蘭營養生長期間，對葉片與根部生長影響小，但鉀主要供給生殖生長期間植株的花朵與花梗發育所需。由於蝴蝶蘭可能具貯藏養分的功能，使本試驗中缺鉀植株於低溫誘導開花後仍無葉片黃化徵狀，僅抽梗延後及花徑較小。但根據前人研究指出，隨著鉀肥濃度提高，蝴蝶蘭的花梗長度、花梗直徑皆增加，且花朵數較高、花朵較大(雷，2007; Wang, 2007)，因此於蝴蝶蘭栽培期間，鉀肥穩定供給仍為重要。

## 二、不同生長階段的蝴蝶蘭於養分缺乏環境下之表現

蝴蝶蘭於不同生長階段之組培苗、中苗、大苗，植株對缺肥的反應並不一致(陳，2014; 游，2012; 雷，2007; Susilo and Chang, 2014; Yoneda et al., 1997)。

在本試驗中，所使用之試驗材料為 *Phal. Sogo Yukidian* ‘V3’的 2.8 寸中苗，與游(2012)使用之規格相同，結果亦與游(2012)相似。中苗植株於缺氮、缺磷處理下 8 週後，植株葉片生長速率開始減緩，但外觀沒有差異(游，2012)。本試驗中，無法由外觀看出缺肥徵狀，各處理下皆葉色濃綠(圖 3.2)，但以葉綠素計讀器測量，缺氮與全缺植株之 SPAD 值最低，缺磷植株次之(表 3.6)。長期缺肥處理後，外觀徵狀才漸趨明顯，缺肥 32 週後，缺氮植株皆明顯矮小、生長不良、葉色變黃；缺





### 磷植株葉片變紫(圖 3.3)

陳(2014)針對蝴蝶蘭 *Phal. amabilis* 和 *Phal. Sogo Yukidian* 'V3' 兩品種之組培苗進行不同元素氮、磷、鉀、鈣、鎂、鐵缺乏試驗，經過 3 個月後，缺氮植株根部較長、缺鉀植株明顯矮小，其他元素缺乏徵狀不明顯。缺乏養分 6 個月後，缺氮植株下位葉黃化嚴重、根部有向上生長情形、新生葉片生長不良；缺磷植株徵狀不明顯，但根部出現吸收毛，有些根停止生長；缺鉀植株小、新生葉片呈紫紅色或中位葉出現葉緣壞疽、根部短小且停止生長。

雷(2007)使用 *Phal. amabilis* 大苗(具開花能力之植株)，施用不同濃度之氮(0、7.1、14.3、21.6 mM)、磷(0、0.7、1.4、2.1 mM)、鉀(0、2.1、4.2、6.4 mM)肥料，試驗時間總共 18 個月，調查不同濃度元素對蝴蝶蘭於第一開花周期與第二開花周期之開花表現的影響，結果顯示，缺乏元素之影響於第二開花周期較明顯，缺鉀下花朵數減少且花朵變小，缺氮植株鮮重低，但各處理對於抽梗及開花日期、花朵壽命皆無差異。蝴蝶蘭大苗可能體內蓄積充足的養分，開花期間可運用早期貯存的氮肥，將之運移至花梗與花朵使用(Susilo et al., 2014)，使大苗於缺肥下不會影響開花表現(Susilo and Chang, 2014; Wang and Gregg, 1994)。

綜合上述現象，可看出蝴蝶蘭對於養分可能具有貯藏之能力，組培苗因植株最年輕，缺肥現象較快出現且最嚴重；中苗於長期缺肥下才有明顯的差異，且經開花後其缺肥現象較營養生長下植株嚴重；大苗最成熟，對養分逆境具有強的耐受性。

### 三、養分缺乏對蝴蝶蘭營養生長與生殖生長的影響

蝴蝶蘭從營養生長狀態下轉變至生殖生長，主要是受到低溫誘導，當蝴蝶蘭轉移至日夜溫 25/20 °C 以下的環境時，會促進抽梗，若一直維持在 28 °C 以上的高溫下，植株只會持續葉片的生長(Blanchard and Runkle, 2006; Sakanishi et al., 1980)。

而花梗與花朵在生殖生長期間扮演強積儲之角色，葉片則供給礦物元素予花序生長(彭，2008; Susilo et al., 2013)。因此本試驗中，蝴蝶蘭於處理 8 週後，分別置於 30/25 °C 環境維持營養生長，或移至 25/20 °C 環境誘導生殖生長，其結果顯示抽梗開花後之蝴蝶蘭其缺肥徵狀較明顯，缺氮與缺磷分別使植株葉色明顯變黃、變紫(圖 3.3)，生殖生長下植株 SPAD 值於所有處理間皆低於營養生長下植株(表 3.8、3.10)，第一片成熟葉之葉面積以營養生長下植株較高(表 3.8、3.10)，可能因蝴蝶蘭於適溫(30/25 °C)環境下葉片有較高的光合作用效率(Guo and Lee, 2006)。

有趣的是，栽培於 30/25 °C 環境下的蝴蝶蘭缺氮 32 週後，儘管植株未經低溫誘導，缺氮的植株仍有 33% - 56%的植株抽梗(表 3.8)。可能原因為，植株碳氮比提高。前人研究提出，當植物的莖頂分生組織(shoot apical meristem, SAM)內碳水化合物與氮不均勻時，會促進芽體的營養或生殖生長階段改變，氮濃度於莖頂分生組織的濃度下降，促進莖頂轉變為誘導花芽分化模式(Chiera et al., 2002; Raper et al., 1988; Rideout et al., 1992)。而在一些花卉作物的組織培養過程，例如夏堇(*Torenia fournieri* Lind.)與裂葉牽牛(*Pharbitis*)，利用降低培養基內的氮元素，可促進花芽分化(Ishioka et al., 1991; Tanimoto and Harada, 1981)。然而，從低溫誘導下的缺氮蝴蝶蘭的開花表現來看，雖然開花率 100% (圖 3.6)，但花朵品質不佳(表 3.12)。

#### 四、蝴蝶蘭於養分缺乏下的光合作用

蝴蝶蘭為景天酸代謝(Crassulacean acid metabolism, CAM)植物，氣孔於夜晚開放並交換二氧化碳，經 PEPC (Phosphoenolpyruvate carboxylase)固定成四碳蘋果酸，儲存於液胞中；白天關閉氣孔，再釋放至葉綠體內並通過 Rucisco 還原成碳水化合物，二氧化碳固定效率高(洪，2012; Guo and Lee, 2006)。植物的光合作用直接影響植物的生長與發育，並受到礦物營養調控，因此各營養元素對於光合作用效率之影響及機制，值得探討及研究。

葉片的光合作用能力與葉片中的氮肥濃度呈現正相關(Evans, 1989)。一般作物



如稻米(*Oryza sativa* 'IRS')、棉花(*Gossypium hirsutum* L.)、高粱(*Sorghum* cv. DK 44C)、番茄(*Lycopersicon esculentum* L.)、玉米(*Zea mays* L.)於缺氮環境下，光合作用效率及乾物重累積皆會顯著下降(Guidi et al., 1997; Huber et al., 1989; Longstreth and Nobel, 1980; Watanabe and Yoshida, 1970; Zhao et al., 2005)。本試驗中，缺氮(0N 處理)會造成二氧化碳交換速率與  $F_v/F_m$  值於處理後 7 週開始下降，當植株於生殖生長階段(25/20 °C 的環境)缺氮 32 週後，二氧化碳交換速率與  $F_v/F_m$  值皆呈現最低值(表 3.13、3.14)。蝴蝶蘭(*Phal.* Musashino '90' × *Phal.* Hakalau Queen 'America')在缺氮環境下 5 個月，夜間的二氧化碳交換速率亦降低(Yoneda et al., 1997)。缺氮造成植物光合作用效率下降，其可能原因為，缺氮造成葉片內葉綠體濃度降低，因此使單位面積下光合作用效率顯著下降(Watanabe and Yoshida, 1970; Zhao et al., 2005)，並伴隨著氣孔導度降低(Guidi et al., 1997; Longstreth and Nobel, 1980)，降低二氧化碳同化效率(Heitholt et al., 1991)，或因光合酵素、Rubisco、PEPcase 等含量減少所致(Osaki et al., 1993)，而缺氮下會造成  $F_v/F_m$  值降低，可能因缺氮抑制蛋白質合成，光系統 II (Photosystem II, PSII)受到傷害且無法恢復或自天線系統(antennae)轉移激發能量之效率降低(Guidi et al., 1997; Lima et al., 1999)。總結上述，缺氮造成植物光合速率下降，伴隨著葉面積減少，最後導致乾物重累積降低、產量差。

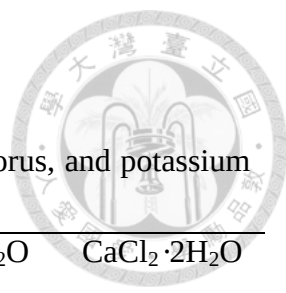
磷為大部分有機化合物之組成成分，並參與光合作用中光反應與暗反應的生化反應。稻米(*Oryza sativa* 'IRS')於缺磷下，葉綠素濃度沒有差異，但單位葉綠體下之光合作用效率下降(Watanabe and Yoshida, 1970)；菜豆(*Phaseolus vulgaris* L.)於缺磷 12 天後，二氧化碳交換速率顯著地下降，但  $F_v/F_m$  值及葉綠素濃度沒有差異(Lima et al., 1999)；向日葵(*Helianthus annuus* L.)暗反應的酵素作用受缺磷而抑制，進而使光合作用速率下降(Jacob and Lawlor, 1992; Plesniar et al., 1994)；大豆於缺磷環境下，會降低葉片展開率，並使飽和點之最大光合作用速率下降(Fredeeen et al., 1989)。本試驗中，蝴蝶蘭於缺磷 25、32 週後， $F_v/F_m$  值與對照組無差異，但二氧化碳交換速率皆下降(表 3.13、3.14)。推測蝴蝶蘭於缺磷下，PSII 系統與效率未受

到傷害，但缺磷會使碳反應中 Rubisco 的活性下降、抑制 RuBP 再生的能力，最終降低卡爾文循環的固碳效率(Jacob and Lawlor, 1992; Plesničar et al., 1994)。

植物的葉片氣孔之開關受到鉀離子調控。多數研究中指出，玉米(*Zea mays*)、棉花(*Gossypium hirsutum* L.)等作物於缺鉀下，光合作用效率之下降原因為氣孔因素導致(Bednarz et al., 1998; Peaslee and Moss, 1968)。鉀可增加氣孔導度，使二氧化碳進入葉肉細胞，缺鉀會抑制氣孔導度，影響氣體交換，但 PS I 與 PS II 的活性和 RuBP 之活性不會受到缺鉀影響(Peoples and Koch, 1979)。然而，當嚴重缺鉀時，氣孔可能非主要因子，可能因醣類累積於葉片中，韌皮部之裝載受阻，醣類運移受限而使 CO<sub>2</sub> 無法有效代謝(Zhao et al., 2001)。另外，對低鉀敏感之大豆品系(*Glycine max* L. c.v. Tiefeng 31)於缺鉀下  $F_v/F_m$  值下降，受到  $F_0/F_m$  值上升之影響，表示有能量損失之情形發生於光合色素傳遞能量至反應中心的過程。但是，在本試驗中，蝴蝶蘭無論於營養生長下或經過低溫誘導開花，缺鉀對光合作用產生的影響小，二氧化碳交換速率及  $F_v/F_m$  值皆與對照組無差異(表 3.13、3.14)，可能植株體內蓄積的鉀元素濃度足夠，因此無觀察到蝴蝶蘭光合作用受缺鉀而抑制之情形。

表 3.1. 八種不同氮、磷、鉀濃度肥料處理之養液配方

Table 3.1. The eight nutrient solutions of different nitrogen, phosphorus, and potassium concentration.



| Fertilizer treatment <sup>z</sup> | NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O | KCl (mM) | MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O |
|-----------------------------------|---------------------------------|------------------------------------------------------|----------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| +NPK                              | 7.14                            | 1.61                                                 | 3.84     | 1                                    | 4                                    |
| 0.1N                              | 0.71                            | 1.61                                                 | 3.84     | 1                                    | 4                                    |
| 0N                                | 0                               | 1.61                                                 | 3.84     | 1                                    | 4                                    |
| 0.1P                              | 7.14                            | 0.16                                                 | 3.84     | 1                                    | 4                                    |
| 0P                                | 7.14                            | 0                                                    | 3.84     | 1                                    | 4                                    |
| 0.1K                              | 7.14                            | 1.61                                                 | 0.38     | 1                                    | 4                                    |
| 0K                                | 7.14                            | 1.61                                                 | 0        | 1                                    | 4                                    |
| -NPK                              | 0                               | 0                                                    | 0        | 1                                    | 4                                    |

<sup>z</sup> The Concentrations of minor elements in nutrient solutions: 0.1 μM NiSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O, 25 μM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 5 μM MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 2 μM ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5 μM CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.1 μM H<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 4 μM FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 4 μM Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O

表 3.2. 缺乏不同氮、磷、鉀濃度 4 週後對蝴蝶蘭(*Phalaenopsis Sogo Yukidian* ‘V3’) 總葉數、葉長、葉面積及第一片成熟葉長、葉面積、葉綠素計讀值的影響

Table 3.2. Effect of different concentration deficiency of nitrogen, phosphorus, and potassium on total leaf number, length, area, and the 1<sup>st</sup> mature leaf length, area, SPAD value in *Phalaenopsis Sogo Yukidian* ‘V3’ after 4 weeks of treatment.

| Fertilizer treatment | Total leaves       |             |                                      | 1 <sup>st</sup> mature leaf <sup>x</sup> |                         |            |
|----------------------|--------------------|-------------|--------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------|------------|
|                      | Number             | Length (cm) | Area <sup>y</sup> (cm <sup>2</sup> ) | Length (cm)                              | Area (cm <sup>2</sup> ) | SPAD value |
| +NPK                 | 4.8 a <sup>z</sup> | 43.8 a      | 139.0 a                              | 11.4 ab                                  | 41.5 abc                | 56.9 a     |
| 0.1N                 | 4.7 a              | 41.6 a      | 131.2 a                              | 11.2 ab                                  | 41.5 abc                | 56.4 a     |
| 0N                   | 4.8 a              | 44.6 a      | 142.0 a                              | 11.8 a                                   | 43.4 a                  | 57.1 a     |
| 0.1P                 | 4.9 a              | 43.5 a      | 134.2 a                              | 11.4 ab                                  | 41.7 abc                | 57.8 a     |
| 0P                   | 5.1 a              | 45.1 a      | 139.7 a                              | 11.7 ab                                  | 42.0 abc                | 57.2 a     |
| 0.1K                 | 5.2 a              | 45.1 a      | 135.4 a                              | 11.2 b                                   | 39.7 c                  | 57.5 a     |
| 0K                   | 5.1 a              | 45.2 a      | 133.4 a                              | 11.3 ab                                  | 40.0 bc                 | 55.7 a     |
| -NPK                 | 5.2 a              | 44.64 a     | 136.0 a                              | 11.7 ab                                  | 42.8 ab                 | 56.2 a     |
| <i>P</i> value       | 0.6533             | 0.7654      | 0.5909                               | 0.2731                                   | 0.1723                  | 0.6313     |

<sup>z</sup> Means followed by a different letter in columns are significantly different at  $P \leq 0.05$  by LSD test; n = 4.

<sup>y</sup> Leaf area was estimated by (leaf length) x (leaf width ) x 0.7221.

<sup>x</sup> The 1<sup>st</sup> mature leaf was counted from the top.

表 3.3. 缺乏不同氮、磷、鉀濃度 4 週後對蝴蝶蘭(*Phalaenopsis Sogo Yukidian* 'V3')  
總鮮重、地上部鮮重、地下部鮮重及總乾重、地上部乾重、地下部乾重的影  
響

Table 3.3. Effect of different concentration deficiency of nitrogen, phosphorus, and potassium on total fresh weight, shoot fresh weight, root fresh weight, total dry weight, shoot dry weight, root dry weight, in *Phalaenopsis Sogo Yukidian* 'V3' after 4 weeks of treatment.

| Fertilizer treatment | Fresh weight (g)     |         |        | Dry weight (g) |        |       |
|----------------------|----------------------|---------|--------|----------------|--------|-------|
|                      | Total                | Shoot   | Root   | Total          | Shoot  | Root  |
| +NPK                 | 34.1 ab <sup>z</sup> | 22.1 ab | 12.0 a | 1.9 ab         | 1.1 ab | 0.9 a |
| 0.1N                 | 32.3 ab              | 20.2 b  | 12.1 a | 1.9 b          | 1.0 b  | 0.8 a |
| 0N                   | 35.2 a               | 22.8 a  | 12.4 a | 2.1 a          | 1.2 a  | 0.9 a |
| 0.1P                 | 33.0 ab              | 21.0 ab | 12.0 a | 2.0 ab         | 1.1 ab | 0.9 a |
| 0P                   | 34.0 ab              | 22.2 ab | 11.9 a | 2.0 ab         | 1.1 ab | 0.9 a |
| 0.1K                 | 32.4 ab              | 20.5 b  | 12.0 a | 2.0 ab         | 1.1 ab | 0.9 a |
| 0K                   | 31.8 b               | 20.5 b  | 11.4 a | 1.9 b          | 1.0 b  | 0.9 a |
| -NPK                 | 32.9 ab              | 21.1 ab | 11.8 a | 1.9 ab         | 1.0 b  | 0.9 a |
| P value              | 0.4463               | 0.1601  | 0.8971 | 0.4372         | 0.1022 | 0.472 |

<sup>z</sup> Means followed by a different letter in columns are significantly different at  $P \leq 0.05$  by LSD test; n = 4.

表 3.4. 缺乏不同氮、磷、鉀濃度 8 週後對蝴蝶蘭(*Phalaenopsis Sogo Yukidian* ‘V3’) 總葉數、葉長、葉面積及第一片成熟葉長、葉面積、葉綠素計讀值的影響

Table 3.4. Effect of different concentration deficiency of nitrogen, phosphorus, and potassium on total leaf number, length, area, and the 1<sup>st</sup> mature leaf length, area, SPAD value in *Phalaenopsis Sogo Yukidian* ‘V3’ after 8 weeks of treatment.

| Fertilizer treatment | Total leaves       |             |                                      | 1 <sup>st</sup> mature leaf <sup>x</sup> |                         |            |
|----------------------|--------------------|-------------|--------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------|------------|
|                      | Number             | Length (cm) | Area <sup>y</sup> (cm <sup>2</sup> ) | Length (cm)                              | Area (cm <sup>2</sup> ) | SPAD value |
| +NPK                 | 6.0 a <sup>z</sup> | 50.0 a      | 162.3 a                              | 14.9 ab                                  | 62.4 ab                 | 56.9 a     |
| 0.1N                 | 5.3 a              | 45.5 b      | 154.1 abc                            | 14.3 bc                                  | 58.4 bc                 | 56.4 a     |
| 0N                   | 5.7 a              | 46.6 ab     | 152.2 bc                             | 13.7 cde                                 | 55.8 cd                 | 57.1 a     |
| 0.1P                 | 5.8 a              | 49.3 ab     | 162.3 a                              | 15.2 a                                   | 63.9 a                  | 57.8 a     |
| 0P                   | 5.8 a              | 47.2 ab     | 158.8 ab                             | 14.9 ab                                  | 63.0 a                  | 57.2 a     |
| 0.1K                 | 5.6 a              | 45.3 b      | 146.7 c                              | 14.1 cd                                  | 54.6 cd                 | 57.5 a     |
| 0K                   | 5.9 a              | 48.5 ab     | 155.7 abc                            | 13.5 de                                  | 52.8 de                 | 55.7 a     |
| -NPK                 | 5.9 a              | 46.3 ab     | 146.8 c                              | 13.1 e                                   | 49.9 e                  | 56.2 a     |
| <i>P</i> value       | 0.5245             | 0.2722      | 0.0094                               | < 0.0001                                 | < 0.0001                | 0.6314     |

<sup>z</sup> Means followed by a different letter in columns are significantly different at  $P \leq 0.05$  by LSD test; n = 4.

<sup>y</sup> Leaf area was estimated by (leaf length) x (leaf width ) x 0.7221.

<sup>x</sup> The 1<sup>st</sup> mature leaf was counted from the top.



表 3.5. 缺乏不同氮、磷、鉀濃度 8 週後對蝴蝶蘭(*Phalaenopsis Sogo Yukidian* ‘V3’) 總鮮重、地上部鮮重、地下部鮮重及總乾重、地上部乾重、地下部乾重的影響

Table 3.5. Effect of different concentration deficiency of nitrogen, phosphorus, and potassium on total fresh weight, shoot fresh weight, root fresh weight, total dry weight, shoot dry weight, root dry weight, in *Phalaenopsis Sogo Yukidian* ‘V3’ after 8 weeks of treatment.

| Fertilizer treatment | Fresh weight (g)     |          |        | Dry weight (g) |          |         |
|----------------------|----------------------|----------|--------|----------------|----------|---------|
|                      | Total                | Shoot    | Root   | Total          | Shoot    | Root    |
| +NPK                 | 40.8 ab <sup>z</sup> | 26.7 ab  | 14.1 a | 2.45 ab        | 1.35 a   | 1.10 b  |
| 0.1N                 | 40.4 ab              | 25.5 abc | 14.8 a | 2.44 ab        | 1.31 ab  | 1.12 ab |
| 0N                   | 40.6 ab              | 25.0 bcd | 15.5 a | 2.56 a         | 1.31 ab  | 1.25 a  |
| 0.1P                 | 42.0 a               | 27.2 a   | 14.7 a | 2.44 ab        | 1.35 a   | 1.09 b  |
| 0P                   | 41.8 a               | 26.6 ab  | 15.2 a | 2.44 ab        | 1.32 ab  | 1.12 b  |
| 0.1K                 | 38.6 b               | 23.8 cd  | 14.7 a | 2.31 b         | 1.22 bc  | 1.09 b  |
| 0K                   | 39.6 ab              | 24.9 bcd | 14.7 a | 2.41 ab        | 1.29 abc | 1.12 b  |
| -NPK                 | 37.8 b               | 23.3 d   | 14.6 a | 2.33 b         | 1.20 c   | 1.13 ab |
| <i>P</i> value       | 0.1003               | 0.0025   | 0.7031 | 0.3778         | 0.056    | 0.254   |

<sup>z</sup> Means followed by a different letter in columns are significantly different at  $P \leq 0.05$  by LSD test; n = 4.

表 3.6. 缺乏不同氮、磷、鉀濃度 12 週後對蝴蝶蘭(*Phalaenopsis Sogo Yukidian* ‘V3’) 總葉數、葉長、葉面積及第一片成熟葉長、葉面積、葉綠素計讀值的影響

Table 3.6. Effect of different concentration deficiency of nitrogen, phosphorus, and potassium on total leaf number, length, area, and the 1<sup>st</sup> mature leaf length, area, SPAD value in *Phalaenopsis Sogo Yukidian* ‘V3’ after 12 weeks of treatment.

| Fertilizer treatment | Total leaves       |             |                                      | 1 <sup>st</sup> mature leaf <sup>x</sup> |                         |            |
|----------------------|--------------------|-------------|--------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------|------------|
|                      | Number             | Length (cm) | Area <sup>y</sup> (cm <sup>2</sup> ) | Length (cm)                              | Area (cm <sup>2</sup> ) | SPAD value |
| +NPK                 | 5.4 a <sup>z</sup> | 51.4 ab     | 174.1 ab                             | 15.1 abc                                 | 64.0 b                  | 58.8 abc   |
| 0.1N                 | 5.4 a              | 47.7 bc     | 162.5 cde                            | 15.0 bc                                  | 64.3 b                  | 53.2 de    |
| 0N                   | 5.3 a              | 45.0 cd     | 152.7 e                              | 13.9 e                                   | 59.1 c                  | 50.5 e     |
| 0.1P                 | 5.3 a              | 51.6 a      | 181.1 a                              | 15.4 ab                                  | 65.9 ab                 | 57.5 bc    |
| 0P                   | 5.3 a              | 49.8 ab     | 172.7 abc                            | 15.6 a                                   | 68.1 a                  | 57.0 c     |
| 0.1K                 | 5.6 a              | 51.2 ab     | 166.8 bcd                            | 14.6 cd                                  | 58.5 c                  | 61.2 a     |
| 0K                   | 5.4 a              | 48.7 abc    | 161.1 de                             | 14.3 de                                  | 56.9 c                  | 60.1 ab    |
| -NPK                 | 5.2 a              | 42.4 d      | 140.5 f                              | 13.2 f                                   | 51.1 d                  | 53.9 d     |
| <i>P</i> value       | 0.8008             | 0.0005      | < 0.0001                             | < 0.0001                                 | < 0.0001                | < 0.0001   |

<sup>z</sup> Means followed by a different letter in columns are significantly different at  $P \leq 0.05$  by LSD test; n = 4.

<sup>y</sup> Leaf area was estimated by (leaf length) x (leaf width ) x 0.7221.

<sup>x</sup> The 1<sup>st</sup> mature leaf was counted from the top.

表 3.7. 缺乏不同氮、磷、鉀濃度 12 週後對蝴蝶蘭(*Phalaenopsis Sogo Yukidian* ‘V3’) 總鮮重、地上部鮮重、地下部鮮重及總乾重、地上部乾重、地下部乾重的影響

Table 3.7. Effect of different concentration deficiency of nitrogen, phosphorus, and potassium on total fresh weight, shoot fresh weight, root fresh weight, total dry weight, shoot dry weight, root dry weight, in *Phalaenopsis Sogo Yukidian* ‘V3’ after 12 weeks of treatment.

| Fertilizer treatment | Fresh weight (g)     |          |          | Dry weight (g) |         |        |
|----------------------|----------------------|----------|----------|----------------|---------|--------|
|                      | Total                | Shoot    | Root     | Total          | Shoot   | Root   |
| +NPK                 | 46.9 ab <sup>z</sup> | 29.3 ab  | 17.6 bc  | 2.9 abc        | 1.5 abc | 1.5 a  |
| 0.1N                 | 46.7 ab              | 27.6 bc  | 19.1 ab  | 2.9 abc        | 1.4 bcd | 1.5 a  |
| 0N                   | 42.3 cd              | 25.1 d   | 17.2 c   | 2.8 abc        | 1.4 de  | 1.5 a  |
| 0.1P                 | 49.0 a               | 30.6 a   | 18.4 abc | 3.0 ab         | 1.6 a   | 1.5 a  |
| 0P                   | 49.2 a               | 29.6 a   | 19.7 a   | 3.0 a          | 1.5 ab  | 1.4 a  |
| 0.1K                 | 46.2 b               | 27.6 bc  | 18.6 abc | 2.8 abc        | 1.4 cd  | 1.4 a  |
| 0K                   | 44.7 bc              | 26.4 cd  | 18.3 abc | 2.7 c          | 1.3 de  | 1.4 a  |
| -NPK                 | 40.5 d               | 22.5 e   | 18.0 bc  | 2.8 bc         | 1.3 e   | 1.4 a  |
| <i>P</i> value       | < 0.0001             | < 0.0001 | 0.0931   | 0.1541         | 0.0012  | 0.3497 |

<sup>z</sup> Means followed by a different letter in columns are significantly different at  $P \leq 0.05$  by LSD test; n = 4.

表 3.8. 在日夜溫 30/25 °C 人候室下，缺乏不同氮、磷、鉀濃度 32 週後對蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis Sogo Yukidian* ‘V3’)總葉數、葉長、葉面積及第一片成熟葉長、葉面積、葉綠素計讀值及抽梗率的影響

Table 3.8. Effect of different concentration deficiency of nitrogen, phosphorus, and potassium on total leaf number, length, area, and the 1<sup>st</sup> mature leaf length, area, SPAD value and spiking rate in *Phalaenopsis Sogo Yukidian* ‘V3’ after 32 weeks of treatment in 30/25 °C phytotron.

| Fertilizer treatment | Total leaves       |             |                                      | 1 <sup>st</sup> mature leaf <sup>x</sup> |                         |            | Spiking rate (%) |
|----------------------|--------------------|-------------|--------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------|------------|------------------|
|                      | Number             | Length (cm) | Area <sup>y</sup> (cm <sup>2</sup> ) | Length (cm)                              | Area (cm <sup>2</sup> ) | SPAD value |                  |
| +NPK                 | 4.1 a <sup>z</sup> | 55.1 a      | 220.1 a                              | 17.2 a                                   | 71.3 a                  | 51.1 bc    | 0                |
| 0.1N                 | 2.8 bc             | 34.7 c      | 137.5 cd                             | 14.1 bcd                                 | 58.9 abc                | 35.2 e     | 33               |
| 0N                   | 2.6 c              | 31.7 c      | 124.5 cd                             | 13.1 cd                                  | 51.8 bc                 | 37.2 e     | 56               |
| 0.1P                 | 3.2 b              | 42.4 b      | 174.7 b                              | 15.9 ab                                  | 67.5 a                  | 54.5 ab    | 0                |
| 0P                   | 2.6 c              | 35.1 c      | 142.9 c                              | 14.9 bc                                  | 62.9 ab                 | 48.7 c     | 0                |
| 0.1K                 | 4.2 a              | 53.0 a      | 207.1 a                              | 15.9 ab                                  | 65.1 a                  | 54.5 ab    | 0                |
| 0K                   | 4.3 a              | 52.5 a      | 199.4 ab                             | 14.8 bc                                  | 59.6 abc                | 57.7 a     | 0                |
| -NPK                 | 2.4 c              | 28.5 c      | 107.6 d                              | 12.7 d                                   | 49.4 c                  | 42.1 d     | 56               |
| P value              | <0.0001            | <0.0001     | <0.0001                              | 0.0023                                   | 0.0275                  | <0.0001    |                  |

<sup>z</sup> Means followed by a different letter in columns are significantly different at  $P \leq 0.05$  by LSD test; n = 3.

<sup>y</sup> Leaf area was estimated by (leaf length) x (leaf width ) x 0.7221.

<sup>x</sup> The 1<sup>st</sup> mature leaf was counted from the top.

表 3.9. 在日夜溫 30/25 °C 人候室下，缺乏不同氮、磷、鉀濃度 32 週後對蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis Sogo Yukidian* ‘V3’) 總鮮重、地上部鮮重、地下部鮮重及總乾重、地上部乾重、地下部乾重的影響

Table 3.9. Effect of different concentration deficiency of nitrogen, phosphorus, and potassium on total fresh weight, shoot fresh weight, root fresh weight, total dry weight, shoot dry weight, root dry weight, in *Phalaenopsis Sogo Yukidian* ‘V3’ after 32 weeks of treatment in 30/25 °C phytotron.

| Fertilizer treatment | Fresh weight (g)    |          |          | Dry weight (g) |          |          |
|----------------------|---------------------|----------|----------|----------------|----------|----------|
|                      | Total               | Shoot    | Root     | Total          | Shoot    | Root     |
| +NPK                 | 74.9 a <sup>z</sup> | 42.4 a   | 32.5 ab  | 5.55 a         | 2.41 a   | 3.14 abc |
| 0.1N                 | 54.6 d              | 25.5 c   | 29.0 bc  | 4.83 b         | 1.66 d   | 3.17 ab  |
| 0N                   | 50.5 d              | 22.1 cd  | 28.4 c   | 4.72 b         | 1.51 de  | 3.21 ab  |
| 0.1P                 | 63.6 bc             | 33.3 b   | 30.3 abc | 5.10 ab        | 2.02 bc  | 3.08 abc |
| 0P                   | 56.3 cd             | 27.4 c   | 28.8 c   | 4.53 b         | 1.76 cd  | 2.76 c   |
| 0.1K                 | 70.0 ab             | 37.2 ab  | 32.9 a   | 5.08 ab        | 2.18 ab  | 2.90 bc  |
| 0K                   | 68.1 ab             | 35.0 b   | 33.1 a   | 5.00 ab        | 2.04 bc  | 2.96 bc  |
| -NPK                 | 48.9 d              | 17.6 d   | 31.3 abc | 4.72 b         | 1.30 e   | 3.42 a   |
| P value              | < 0.0001            | < 0.0001 | 0.0003   | 0.0729         | < 0.0001 | 0.0797   |

<sup>z</sup> Means followed by a different letter in columns are significantly different at  $P \leq 0.05$  by LSD test; n = 3.

表 3.10. 蝴蝶蘭(*Phalaenopsis* Sogo Yukidian ‘V3’)栽培於 30/25 °C 人工氣候室 8 週，接著移至 25/20 °C 人工氣候室 24 週後，缺乏不同氮、磷、鉀處理對總葉數、葉長、葉面積及第一片成熟葉長、葉面積、葉綠素計讀值的影響

Table 3.10. Effect of different concentration deficiency of nitrogen, phosphorus, and potassium on total leaf number, length, area, and the 1<sup>st</sup> mature leaf length, area, SPAD value, in *Phalaenopsis* Sogo Yukidian ‘V3’, which were grown in 30/25 °C phytotron for 8 weeks and then in 25/20 °C phytotron for 24 weeks.

| Fertilizer treatment | Total leaves       |             |                                      | 1 <sup>st</sup> mature leaf <sup>x</sup> |                         |            |
|----------------------|--------------------|-------------|--------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------|------------|
|                      | Number             | Length (cm) | Area <sup>y</sup> (cm <sup>2</sup> ) | Length (cm)                              | Area (cm <sup>2</sup> ) | SPAD value |
| +NPK                 | 4.6 a <sup>z</sup> | 54.1 a      | 205.0 a                              | 15.0 a                                   | 62.4 a                  | 45.2 b     |
| 0.1N                 | 4.0 ab             | 43.4 b      | 155.9 cd                             | 12.5 bc                                  | 49.4 bcd                | 29.5 c     |
| 0N                   | 3.4 bc             | 38.8 bc     | 139.3 de                             | 11.5 c                                   | 41.9 cd                 | 31.2 c     |
| 0.1P                 | 3.3 bc             | 43.7 b      | 175.0 bc                             | 14.9 a                                   | 63.0 a                  | 49.0 ab    |
| 0P                   | 3.2 bc             | 41.7 bc     | 163.7 cd                             | 14.4 a                                   | 60.0 ab                 | 48.3 ab    |
| 0.1K                 | 4.8 a              | 54.1 a      | 197.9 ab                             | 14.1 ab                                  | 55.2 ab                 | 48.4 ab    |
| 0K                   | 4.6 a              | 53.3 a      | 196.7 ab                             | 14.0 ab                                  | 53.0 abc                | 49.6 a     |
| -NPK                 | 3.0 c              | 34.7 c      | 125.1 e                              | 11.4 c                                   | 40.4 d                  | 33.0 c     |
| P value              | 0.0031             | 0.0007      | 0.0002                               | 0.0025                                   | 0.0069                  | <0.0001    |

<sup>z</sup> Means followed by a different letter in columns are significantly different at  $P \leq 0.05$  by LSD test; n = 3.

<sup>y</sup> Leaf area was estimated by (leaf length) x (leaf width) x 0.7221.

<sup>x</sup> The 1<sup>st</sup> mature leaf was counted from the top.

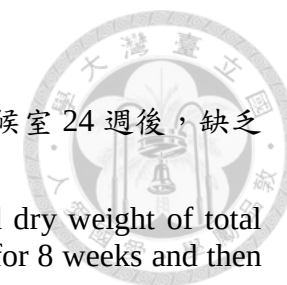


表 3.11. 蝴蝶蘭(*Phalaenopsis Sogo Yukidian* 'V3')栽培於 30/25 °C 人工氣候室 8 週，接著移至 25/20 °C 人工氣候室 24 週後，缺乏不同氮、磷、鉀濃度對整個植株、地上部、地下部、花梗、花朵的鮮重與乾重的影響

Table 3.11. Effect of different concentration deficiency of nitrogen, phosphorus, and potassium on fresh weight and dry weight of total plant, shoot, root, stalk, flowers, in *Phalaenopsis Sogo Yukidian* 'V3', which were grown in 30/25 °C phytotron for 8 weeks and then in 25/20 °C phytotron for 24 weeks.

| Fertilizer treatment | Fresh weight (g)    |         |         |         |         | Dry weight (g) |         |         |          |        |
|----------------------|---------------------|---------|---------|---------|---------|----------------|---------|---------|----------|--------|
|                      | Total               | Shoot   | Root    | Stalk   | Flower  | Total          | Shoot   | Root    | Stalk    | Flower |
| +NPK                 | 88.5 a <sup>z</sup> | 36.1 a  | 30.5 b  | 7.0 a   | 21.4 a  | 6.5 a          | 1.98 a  | 2.84 bc | 1.07 a   | 1.11 a |
| 0.1N                 | 65.9 de             | 26.1 cd | 21.9 c  | 5.5 cd  | 14.4 b  | 4.9 d          | 1.38 b  | 2.10 d  | 0.83 cd  | 0.76 b |
| 0N                   | 60.9 e              | 22.4 de | 20.4 c  | 5.1 de  | 13.0 b  | 4.7 d          | 1.21 b  | 2.09 d  | 0.76 cd  | 0.69 b |
| 0.1P                 | 75.6 bc             | 33.3 ab | 39.9 a  | 5.8 bcd | 16.4 ab | 5.8 bc         | 1.98 a  | 3.66 a  | 0.93 abc | 0.84 b |
| 0P                   | 73.7 cd             | 29.6 bc | 32.3 b  | 6.5 ab  | 16.0 b  | 5.7 c          | 1.78 a  | 2.99 ab | 1.07 a   | 0.78 b |
| 0.1K                 | 85.0 a              | 33.8 ab | 38.0 a  | 6.7 ab  | 12.1 b  | 6.3 ab         | 1.93 a  | 3.24 ab | 1.02 ab  | 0.64 b |
| 0K                   | 83.7 ab             | 33.7 ab | 41.6 a  | 6.1 abc | 12.7 b  | 5.9 bc         | 1.86 a  | 3.34 ab | 0.91 bc  | 0.64 b |
| -NPK                 | 58.4 e              | 19.0 e  | 22.6 c  | 4.6 e   | 12.2 b  | 4.7 d          | 1.12 b  | 2.14 cd | 0.74 d   | 0.66 b |
| P value              | <0.0001             | <0.0001 | <0.0001 | 0.0004  | 0.0137  | <0.0001        | <0.0001 | 0.0011  | 0.0003   | 0.0033 |

<sup>z</sup> Means followed by a different letter in columns are significantly different at  $P \leq 0.05$  by LSD test; n = 3.

表 3.12. 蝴蝶蘭(*Phalaenopsis Sogo Yukidian* 'V3')栽培於 30/25 °C 人工氣候室 8 週，接著移至 25/20 °C 人工氣候室 24 週後，缺乏不同氮、磷、鉀濃度對花梗長、花梗直徑、花朵數、花徑的影響

Table 3.12. Effect of different concentration deficiency of nitrogen, phosphorus, and potassium on stalk length, stalk width, flower number, and flower diameter in *Phalaenopsis Sogo Yukidian* 'V3', which were grown in 30/25 °C phytotron for 8 weeks and then in 25/20 °C phytotron for 24 weeks.

| Fertilizer treatment | Stalk length (cm)   | Stalk width (mm) | Flower number | Flower diameter (cm) |
|----------------------|---------------------|------------------|---------------|----------------------|
| +NPK                 | 41.3 a <sup>z</sup> | 4.5 a            | 4.7 a         | 11.5 a               |
| 0.1N                 | 34.2 b              | 4.1 ab           | 3.2 cd        | 11.0 bc              |
| 0N                   | 32.2 b              | 3.9 ab           | 3.0 d         | 11.0 bc              |
| 0.1P                 | 31.9 b              | 4.0 ab           | 4.0 abc       | 11.0 bc              |
| 0P                   | 39.8 ab             | 4.6 a            | 3.8 bc        | 10.9 bcd             |
| 0.1K                 | 37.4 ab             | 4.3 ab           | 4.3 ab        | 11.1 b               |
| 0K                   | 36.7 ab             | 4.3 ab           | 4.0 abc       | 10.8 cd              |
| -NPK                 | 33.4 b              | 3.6 b            | 3.0 d         | 10.7 d               |
| <i>P</i> value       | 0.1382              | 0.2070           | 0.0098        | 0.0053               |

<sup>z</sup> Means followed by a different letter in columns are significantly different at  $P \leq 0.05$  by LSD test; n = 3.





表 3.13. 蝴蝶蘭(*Phalaenopsis* Sogo Yukidian ‘V3’)栽培於 30/25 °C 或 25/20 °C 人工氣候室下，缺乏不同氮、磷、鉀濃度對淨二氧化碳吸收速率的影響

Table 3.13. Effect of different concentration deficiency of nitrogen, phosphorus, and potassium on net CO<sub>2</sub> uptake rate, in *Phalaenopsis* Sogo Yukidian ‘V3’, which were grown in 30/25 °C or 25/20 °C phytotron.

| Fertilizer treatment      | Net CO <sub>2</sub> uptake rate (μmol · m <sup>-2</sup> · s <sup>-1</sup> ) |         |          |          |          |                               |          |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|---------|----------|----------|----------|-------------------------------|----------|
|                           | Time of treatment at 30/25 °C                                               |         |          |          |          | Time of treatment at 25/20 °C |          |
|                           | 1 week                                                                      | 7 weeks | 12 weeks | 25 weeks | 32 weeks | 25 weeks                      | 32 weeks |
| +NPK                      | 2.25 a <sup>z</sup>                                                         | 2.47 ab | 2.63 ab  | 2.59 a   | 3.00 a   | 2.49 ab                       | 1.85 ab  |
| 0.1N                      | 2.29 a                                                                      | 2.57 ab | 2.05 c   | 2.00 ab  | 1.84 c   | 1.89 bc                       | 1.18 bc  |
| 0N                        | 2.12 a                                                                      | 2.19 b  | 2.19 bc  | 2.26 a   | 2.91 a   | 1.29 c                        | 1.11 c   |
| 0.1P                      | 1.88 a                                                                      | 2.54 ab | 2.55 ab  | 2.00 ab  | 2.60 ab  | 1.95 bc                       | 1.53 abc |
| 0P                        | 2.11 a                                                                      | 2.71 ab | 2.76 a   | 1.45 b   | 1.81 c   | 1.64 c                        | 1.55 abc |
| 0.1K                      | 1.63 a                                                                      | 2.99 a  | 2.50 ab  | 2.33 a   | 2.75 ab  | 2.74 a                        | 1.96 a   |
| 0K                        | 1.77 a                                                                      | 3.00 a  | 2.36 abc | 2.36 a   | 2.75 ab  | 2.82 a                        | 2.04 a   |
| -NPK                      | 1.82 a                                                                      | 2.34 b  | 2.28 bc  | 1.41 b   | 2.26 bc  | 1.72 c                        | 0.98 c   |
| Significance <sup>y</sup> | NS                                                                          | NS      | NS       | *        | **       | **                            | *        |

<sup>z</sup> Means followed by a different letter in columns are significantly different at  $P \leq 0.05$  by LSD test; n = 3.

<sup>y</sup> NS, \*, \*\* indicate means within columns are not significantly different or significantly different according to ANOVA test at  $P \leq 0.05$ , and  $P \leq 0.01$ , respectively; n = 3.

表 3.14. 蝴蝶蘭(*Phalaenopsis* Sogo Yukidian ‘V3’)栽培於 30/25 °C 或 25/20 °C 人工氣候室下，缺乏不同氮、磷、鉀濃度對光系統 II 最大光子利用效率的影響

Table 3.14. Effect of different concentration deficiency of nitrogen, phosphorus, and potassium on maximum quantum efficiency of photosystem II photochemistry, in *Phalaenopsis* Sogo Yukidian ‘V3’, which were grown in 30/25 °C or 25/20 °C phytotron.

| Fertilizer treatment      | Maximum quantum efficiency of photosystem II photochemistry, $F_v/F_m$ |          |          |          |          |                               |          |
|---------------------------|------------------------------------------------------------------------|----------|----------|----------|----------|-------------------------------|----------|
|                           | Time of treatment at 30/25 °C                                          |          |          |          |          | Time of treatment at 25/20 °C |          |
|                           | 2 weeks                                                                | 7 weeks  | 12 weeks | 25 weeks | 32 weeks | 25 weeks                      | 32 weeks |
| +NPK                      | 0.81 ab <sup>z</sup>                                                   | 0.79 abc | 0.81 bc  | 0.80 a   | 0.80 ab  | 0.78 a                        | 0.78 a   |
| 0.1N                      | 0.82 ab                                                                | 0.74 bc  | 0.80 c   | 0.76 c   | 0.76 c   | 0.71 b                        | 0.71 b   |
| 0N                        | 0.82 ab                                                                | 0.74 c   | 0.80 c   | 0.76 c   | 0.76 c   | 0.72 b                        | 0.71 b   |
| 0.1P                      | 0.82 ab                                                                | 0.80 abc | 0.80 c   | 0.79 ab  | 0.79 b   | 0.78 a                        | 0.77 a   |
| 0P                        | 0.81 b                                                                 | 0.80 ab  | 0.81 abc | 0.77 bc  | 0.79 b   | 0.78 a                        | 0.77 a   |
| 0.1K                      | 0.81 ab                                                                | 0.81 a   | 0.82 ab  | 0.81 a   | 0.81 a   | 0.80 a                        | 0.79 a   |
| 0K                        | 0.81 ab                                                                | 0.78 abc | 0.82 a   | 0.81 a   | 0.82 a   | 0.80 a                        | 0.79 a   |
| -NPK                      | 0.82 a                                                                 | 0.77 abc | 0.81 bc  | 0.75 c   | 0.77 c   | 0.72 b                        | 0.71 b   |
| Significance <sup>y</sup> | NS                                                                     | NS       | *        | ***      | ***      | ***                           | ***      |

<sup>z</sup> Means followed by a different letter in columns are significantly different at  $P \leq 0.05$  by LSD test; n = 3.

<sup>y</sup> NS, \*, \*\*\* indicate means within columns are not significantly different or significantly different according to ANOVA test at  $P \leq 0.05$ , and  $P \leq 0.001$ , respectively; n = 3.

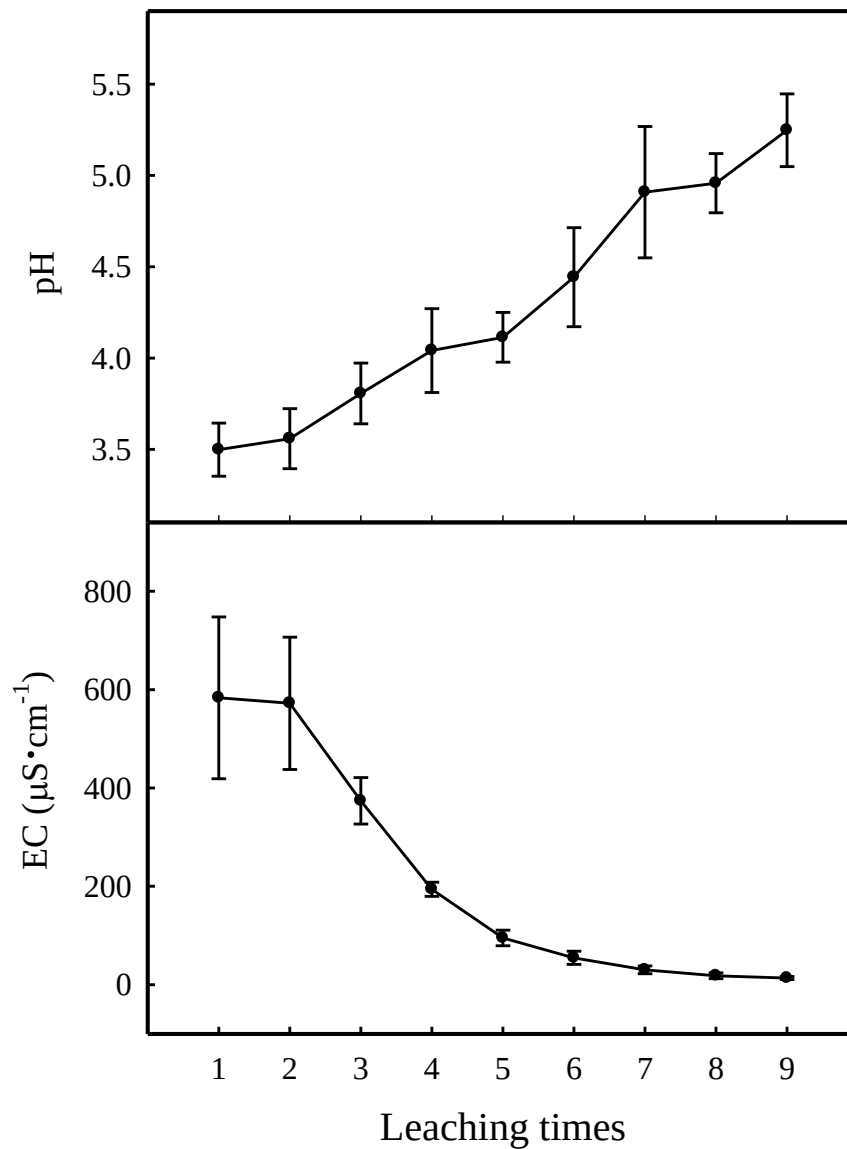


圖 3.1. 在肥料處理前，以 Pour-through 介質溶液測定方法監測介質 EC 與 pH 值的變化。每次淋洗水量為每盆 100 毫升

Fig. 3.1. The change of medium EC and pH was monitored by pour-through. The sphagnum moss substrate was leached with 100 mL dH<sub>2</sub>O for nine times before fertilizer treatment.

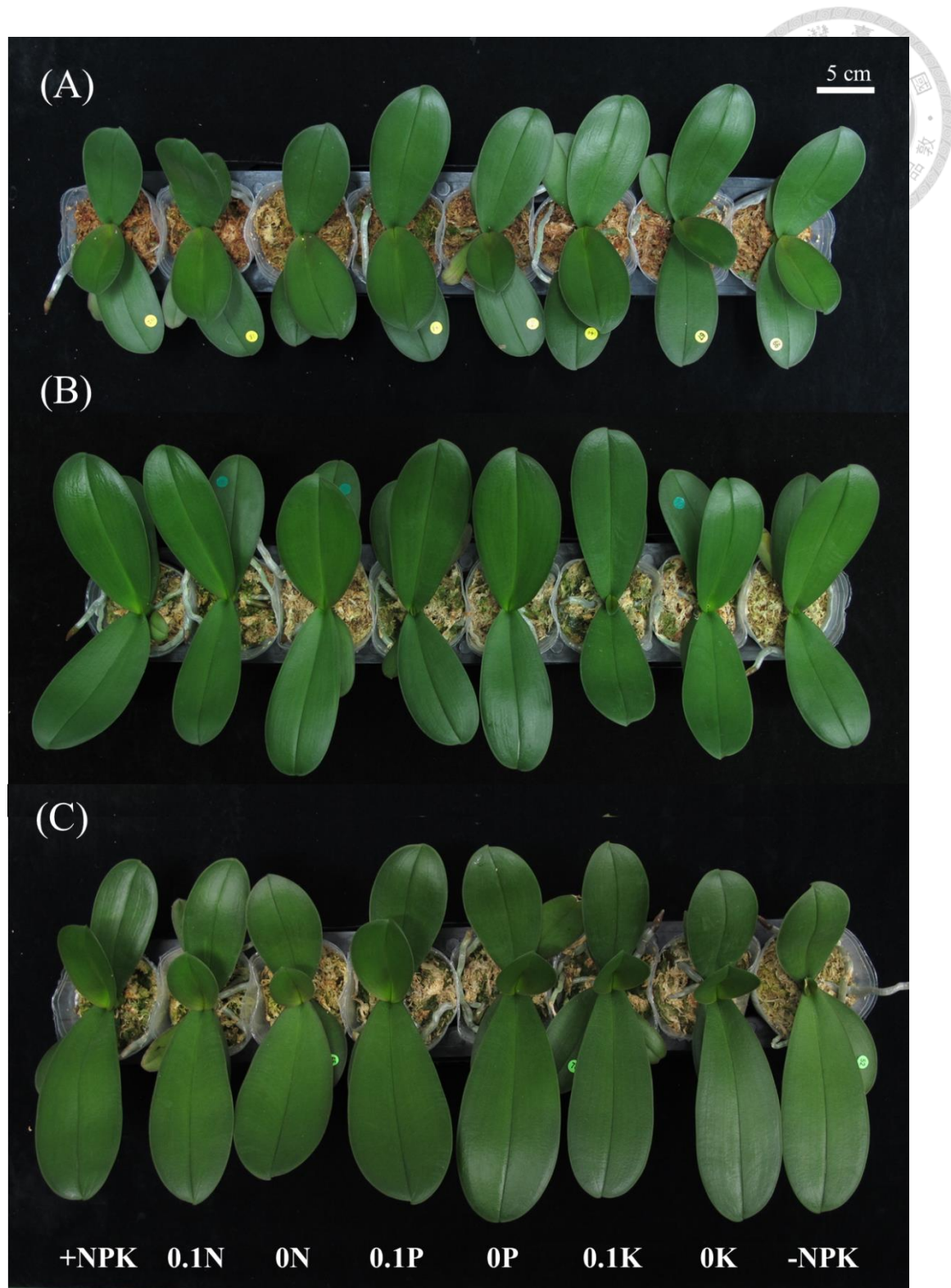


圖 3.2. 蝴蝶蘭(*Phalaenopsis Sogo Yukidian* 'V3')栽培於 30/25 °C 人工氣候室，缺乏不同氮、磷、鉀處理(A) 4 週、(B) 8 週、(C) 12 週後對植株外觀形態的影響。由左自右分別是+NPK、0.1N、0N、0.1P、0P、0.1K、0K、-NPK 處理

Fig. 3.2. Effect of different concentration deficiency of nitrogen, phosphorus, and potassium on morphology of *Phalaenopsis Sogo Yukidian* 'V3' after fertilizer treatment for (A) 4, (B) 8, (C) 12 weeks in 30/25 °C phytotron. Bar = 5 cm.

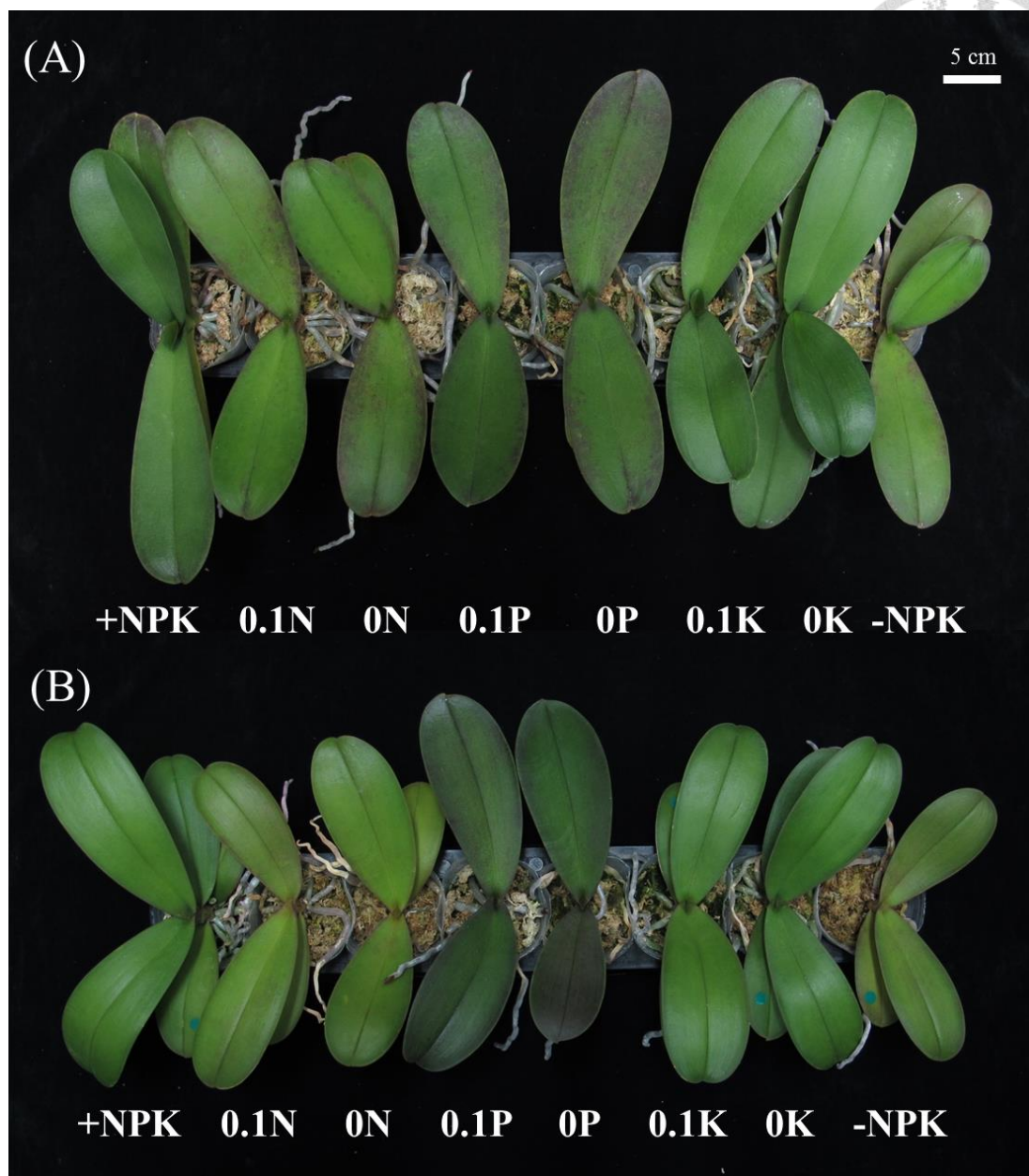


圖 3.3. 蝴蝶蘭(*Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3')栽培於(A) 30/25 °C 人工氣候室 32 週及(B) 30/25 °C 人工氣候室 8 週，接著移至 25/20 °C 人工氣候室 24 週後，缺乏不同氮、磷、鉀處理後對植株外觀形態的影響。由左自右分別是+NPK、0.1N、0N、0.1P、0P、0.1K、0K、-NPK 處理

Fig. 3.3. Effect of different concentration deficiency of nitrogen, phosphorus, and potassium on morphology of *Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3' after fertilizer treatment for (A) 32 weeks in 30/25 °C phytotron and (B) 8 weeks in 30/25 °C phytotron and then 24 weeks in 25/20 °C phytotron. Bar = 5 cm.





圖 3.4. 蝴蝶蘭(*Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3')栽培於 30/25 °C 人工氣候室 8 週，接著移至 25/20 °C 人工氣候室 24 週後，缺乏不同氮、磷、鉀處理後對植株開花表現的影響。分別為(A) +NPK、(B) 0.1N、(C) 0.1P、(D) 0.1K、(E) 0N、(F) 0P、(G) 0K、(H) -NPK 處理

Fig. 3.4. Effect of different concentration deficiency of nitrogen, phosphorus, and potassium on flowering of *Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3' after fertilizer treatment for 8 weeks in 30/25 °C phytotron and then 24 weeks in 25/20 °C phytotron. (A) +NPK, (B) 0.1N, (C) 0.1P, (D) 0.1K, (E) 0N, (F) 0P, (G) 0K, (H) -NPK, respectively. Bar = 10 cm.

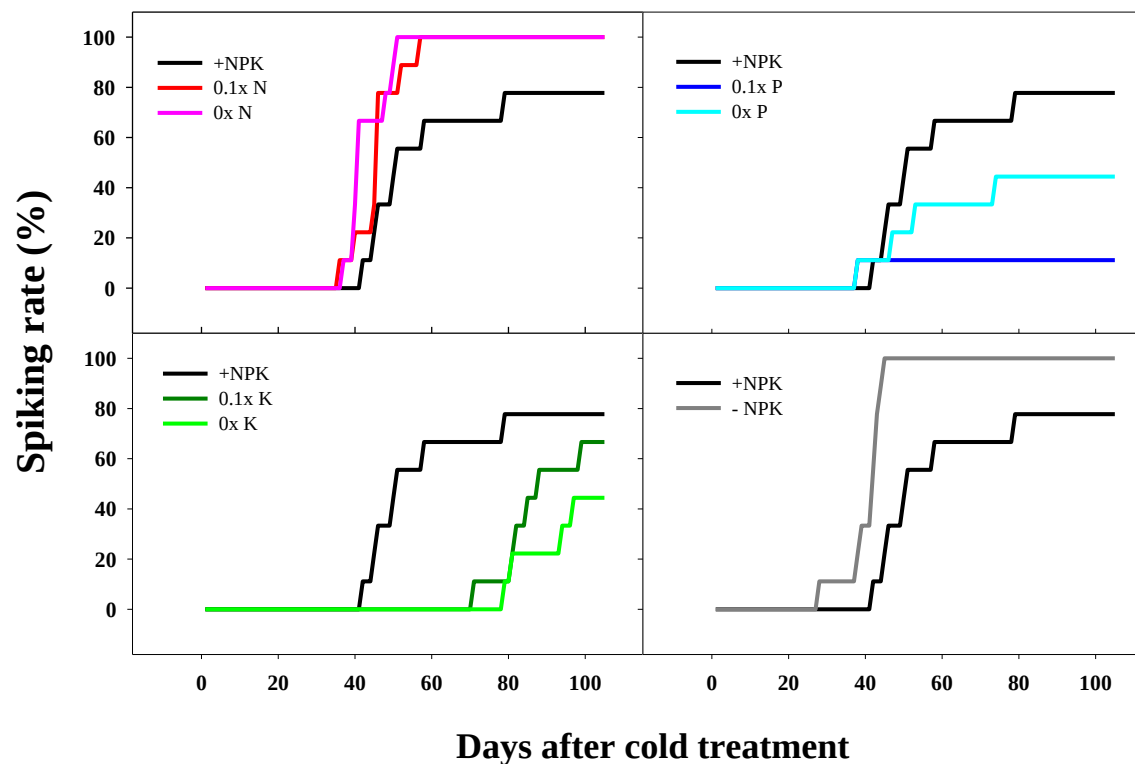


圖 3.5. 蝴蝶蘭(*Phalaenopsis Sogo Yukidian* 'V3')栽培於 30/25 °C 人工氣候室 8 週，接著移至 25/20 °C 人工氣候室 24 週後，缺乏不同氮、磷、鉀處理後對植株抽梗率的影響

Fig. 3.5. Effect of different concentration deficiency of nitrogen, phosphorus, and potassium on spiking rate of *Phalaenopsis Sogo Yukidian* 'V3' after fertilizer treatment for 8 weeks in 30/25 °C phytotron and then 24 weeks in 25/20 °C phytotron.

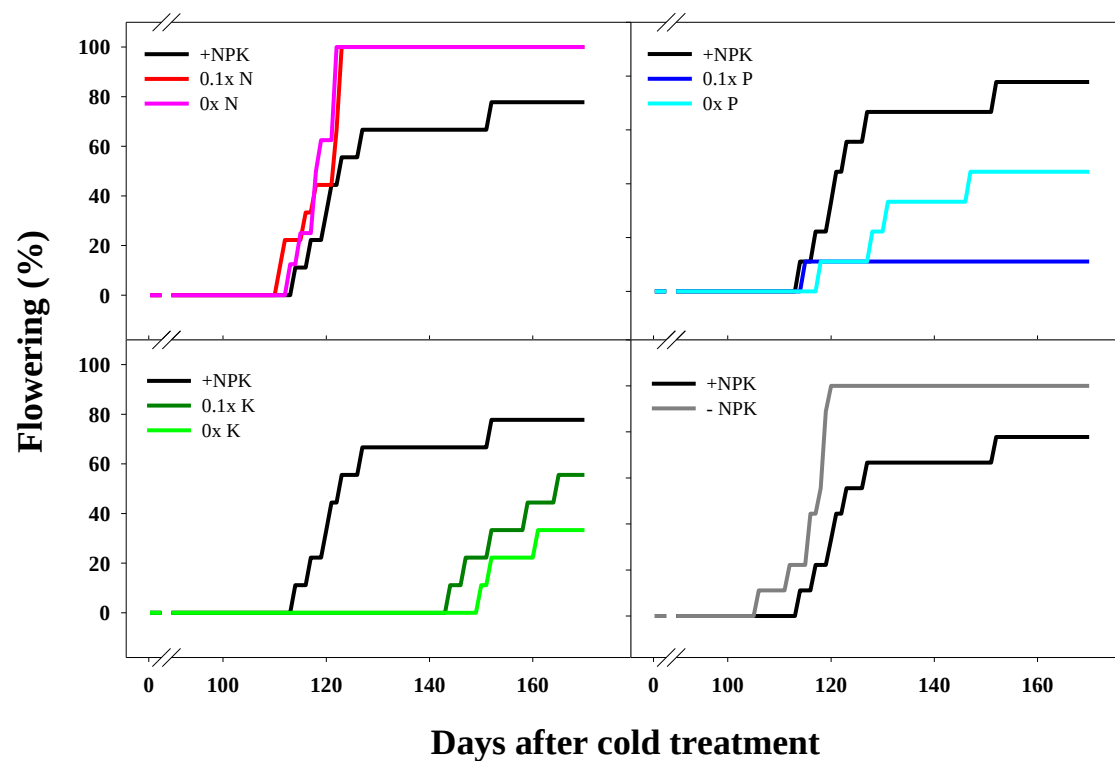


圖 3.6. 蝴蝶蘭(*Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3')栽培於 30/25 °C 人工氣候室 8 週，接著移至 25/20 °C 人工氣候室 24 週後，缺乏不同氮、磷、鉀處理後對植株開花率的影響

Fig. 3.6. Effect of different concentration deficiency of nitrogen, phosphorus, and potassium on flowering rate of *Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3' after fertilizer treatment for 8 weeks in 30/25 °C phytotron and then 24 weeks in 25/20 °C phytotron.



## 第四章 蝴蝶蘭於缺磷下的形態解剖觀察



### 摘要

蝴蝶蘭(*Phalaenopsis* spp.)為著生蘭，即使於養分供給貧乏的環境下仍能生存，可能與本身具有特殊的組織型態有關。本試驗以新鮮切片方式觀察蝴蝶蘭 *Phal.* Sogo Yukidian ‘V3’的根部與葉片的構造組織，其根部的外層具有兩層特化的根被組織，根被的細胞壁具有不規則加厚現象。根部的內皮層和外皮層上有兩種型態的細胞相間排列，分別為細胞壁於內皮層上呈現 O 型及外皮層上呈現 U 型加厚的長細胞，加厚的細胞壁可能具有防止根部內水分散失的功用；另外一種為細胞壁沒有加厚的短細胞，又稱通過細胞，而內皮層中的通過細胞位於早成木質部的向外放射處，可能有利於水分及養分的吸收及運輸。葉片具有多層且富含葉綠體的葉肉細胞，表皮組織外覆有角質層，可防止水分快速蒸散。

磷為植物生長與繁衍所必須之元素，本試驗分別給予蝴蝶蘭 *Phal.* Sogo Yukidian ‘V3’正常栽培與 22-23 週的缺磷逆境處理，並比較根部與葉片的解剖型態變化。缺磷植株的根部與葉片細胞型態與對照組無差異，但缺磷植株的根部中，維管束數目顯著少於對照組，且中柱面積變小，並以根尖往上 1 cm 位置最為顯著。

### 前言

磷(phosphorus, P)，植物生長所必需的元素之一，是植物細胞內重要化合物的組成成分，包括核酸、核蛋白、磷脂質等，也是參與代謝、合成和分解重要的元素(Taiz and Zeiger, 2010)。然而，儘管土壤中具有大量的磷，對植物而言，磷為不易獲取的元素，因植物主要以無機磷酸鹽(inorganic phosphate, Pi)的形式吸收磷肥，但土壤中的磷酸鹽經常與陽離子或其他有機化合物鍵結而沉澱，或被土壤中的微

生物轉換成有機磷，因此導致土壤中的磷酸鹽大多被固定，而無法被植物所吸收利用(Lin et al., 2009; Raghothama, 1999; Raghothama and Karthikeyan, 2005)。當磷肥缺乏時，植物發展出各種模式以適應缺磷的環境，例如改變根部形態、根系結構(Root system architecture, RSA)、與菌根菌共生等(López-Bucio et al., 2003; Lambers et al., 2006; Péret et al., 2011; Williamson et al., 2001)，藉以獲取更多的磷。

蘭科植物(Orchidaceae)為演化上高等的維管束植物，有些蘭花具有假球莖，可幫助貯藏養分，而大部分的物種其根部表皮與皮層組織則具有特殊的結構(Sanford and Adanlawo, 1973)，例如表皮組織分化成一層至多層的根被(velamen)，可能使其對養分的吸收、利用有助益。蝴蝶蘭(*Phalaenopsis* spp.)為一種附生蘭(epiphyte orchid)，具有厚而多肉的葉片及肥胖的氣生根(aerial root) (李和李，1991)，對於養分逆境具有極高的耐受性(游，2012; Susilo and Chang, 2014; Yoneda et al., 1997)。但目前關於蝴蝶蘭在缺乏養分逆境下時，對於葉片及根部內部組織結構的改變相關研究很少，而磷肥又是調控蝴蝶蘭開花表現的重要元素，因此，本試驗給予蝴蝶蘭 *Phal.* Sogo Yukidian ‘V3’ 長時間的缺磷逆境，藉由觀察根部與葉片解剖構造，欲瞭解蝴蝶蘭在缺磷下解剖形態上的變化，並希望進一步探討其根部構造上的特性是否對於養分吸收具有影響。

## 材料方法

### 試驗材料

由屏東科隆國際生物科技有限公司購入大白花蝴蝶蘭(*Phalaenopsis* Sogo Yukidian ‘V3’) 5.3 公分(1.7 寸)盆小苗，除了組培小葉外，均具 3 片完全展開葉及 1 片新生葉，第一片成熟葉(由上往下數第二片葉)的葉長規格均在 9-11 公分。試驗前除去原種植水苔，再以智利水苔種植於 8.5 公分 (2.8 寸)加長型透明軟盆。水苔使用前以自來水浸泡隔夜兩次，並挑除水苔中枯枝落葉等雜質，再以脫水機脫水

至微濕狀態，植株在換盆過程中，測量蝴蝶蘭小苗初始鮮重，並將地下部快速浸泡於稀釋 1000 倍的鋅錳乃浦 80%可濕性粉劑中，最後種植於 100 公克的水苔中。



## 試驗場所

植株栽培於臺灣大學人工氣候室(phytotron)，為電腦調控日夜溫 30/25 °C 的自然光照室，另搭設遮陰網以控制光度於 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  以下，平均濕度控制於 60% 至 70%之間。試驗期間為 102 年 10 月至 103 年 4 月。

## 試驗設計

本試驗目的為觀察蝴蝶蘭於缺磷下的葉片與根部的內部組織結構變化，利用新鮮切片進行解剖觀察。試驗的栽培管理為，植株換盆後移至日夜溫 30/25 °C 人工氣候室，並給予恢復期一個月，僅以一次水灌溉植株，使經換盆處理的根系恢復，接著依植株初始鮮重平均分成 2 組，分別給予+NPK (正常施肥之對照組)與 0P (不含磷肥)的肥料，肥料配方如表 3.1。肥料皆於配置時調整 pH 值至 5.8，每次施肥前先以 200 mL 一次水淋洗介質，之後每盆澆灌 100 mL 的肥料，平均 2 週施肥一次，每處理 20 重複，每重複 1 株。最後於施肥處理後第 22-23 週取樣。

## 新鮮切片方法

切片取樣時，分別自+NPK 對照組與缺磷處理(0P)22-23 週的植株中選取 7 株蝴蝶蘭，固定切取第一片成熟葉葉長一半位置之中肋(midrib)，根部為選取靠近盆壁及水苔中間的根，根尖無受損、無停滯生長，總長度小於 15 公分的根，固定切取由根尖往上量的 1 公分、3 公分、5 公分之切面，切片皆當天新鮮採樣。

切片前，以 1× 磷酸鹽緩衝液(phosphate buffer solution, PBS)配置 5%的瓊脂膠體(Agarose Low EEO, Bio Basic Canada Inc., Markham, Ontario, Canada)，加熱後，等待膠體稍微冷卻，再將葉片中肋包埋其中，根部則無進行包埋。接著，將組織以

瞬間膠固定於震盪切片機(Vibrating blade microtome Leica VT1000S, Leica Biosystems, Nussloch, Germany)之載台上，設定震盪頻率 5，切取厚度約 110  $\mu\text{m}$  (根部)、120  $\mu\text{m}$  (葉片)的切片，並於顯微鏡觀察前先暫存於 PBS 中。



最後將切片置於載玻片上，以 0.01%的甲苯胺藍(toluidine blue O, TBO)染色三分鐘，再以一次水稍微沖洗，蓋上蓋玻片，使用全電動螢光正立顯微鏡(Zeiss Imager. Z1 microscope, Oberkochen, Germany)與全電動螢光解剖顯微鏡(Zeiss SteREO Lumar. V12 microscope, Oberkochen, Germany)進行觀察與拍攝。

註：藥品配置

1. 甲苯胺藍溶於 0.1%的硼酸鈉(sodium tetraborate)溶液中。
2. 10 $\times$  磷酸鹽緩衝液含 1.37 M NaCl、27 mM KCl、100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，調整 pH 值至 7.2-7.4，再經過高壓滅菌後室溫下保存。

## 影像處理與量化方法

使用 AxioVision Rel. 4.8 (Zeiss, Oberkochen, Germany)軟體分析及處理相片，圖片皆利用影像最佳化(Best fit)統一調整圖片的亮度與對比。數據量化方式如下：

1. 根部面積(root area)：根被以內的面積
2. 中柱面積(stele area)：周鞘以內的面積，不包括內皮層
3. 維管束面積(vascular bundle area)：中柱面積扣除髓部面積
4. 通過細胞與長細胞個數(passage cell and long cell number)：以正立螢光顯微鏡拍攝切片時，照射波長 325-560 nm 的光線時，新鮮的根部樣本其木質化(lignification)的細胞會激發螢光。因此，定義有激發螢光的細胞為長細胞，沒有激發螢光的細胞為通過細胞。因為外皮層組織無法於正立螢光顯微鏡(100 $\times$ )視野下完整拍攝，因此，計算外皮層於一個視野下通過細胞與長細胞的個數，再依比例換算。



## 生物統計分析

資料以 Microsoft Excel 2010 (Microsoft, USA)統計軟體，進行非配對 t 值測驗 (unpaired t test)；以 COSTAT 6.2(CoHort Software, CA, USA)統計軟體，進行最小顯著差異分析(Least significant difference, LSD)，分析兩處理間  $P \leq 0.05$  有無顯著性差異。

## 結果

本試驗利用新鮮切片及 TBO 染色方式，解剖觀察蝴蝶蘭葉片與根部形態，並比較缺磷處理對蝴蝶蘭葉片中肋及根部由根尖往上 1、3、5 公分位置之細胞結構的影響。

### 一、蝴蝶蘭形態構造

以解剖顯微鏡觀察蝴蝶蘭根部橫切面(圖 4.1A)，由外往內依序為表皮細胞(epidermal cell)特化而成的根被(velamen)、皮層(cortex)、中柱(vascular stele 或 vascular cylinder)。皮層佔據根部大部分面積，細胞內含有葉綠體(圖 4.1A、D)。中柱內中央為髓(pith)，木質部(xylem)與韌皮部(phloem)呈放射狀維管束排列(radial vascular bundle) (圖 4.1B)。木質部的細胞壁因木質化(lignification)，經 TBO 染色後可明顯看到藍紫色的輪廓，韌皮部則無(圖 4.1C)。皮層最內部為一層特化細胞稱內皮層(endodermis) (圖 4.1C)，內皮層上有兩種形態的細胞相間排列，一種為細胞壁無加厚的通過細胞(passage cell)，又稱為短細胞(short cell)，其位置在相對於早成木質部外的向外放射處，另一種為細胞壁有加厚的長細胞(long cell)，其細胞壁為 O 形加厚，TBO 染色後可明顯看出其 O 形木質化的輪廓(圖 4.1C)。而在皮層最外圍為外皮層(exodermis)與根被(velamen) (圖 4.1D-F)，外皮層也有兩種形態的細胞相間排列，一為細胞壁有加厚的長細胞，細胞較大，其外切線細胞壁(outer tangential



wall)和徑線細胞壁(radial wall)連續性加厚，呈倒 U 形開口朝向皮層，另一種則為薄壁的短細胞(通過細胞)(圖 4.1E)。根被為兩層表皮細胞特化而成，有些根被細胞裡具有類似條帶式加厚的細胞壁(圖 4.1F)。

蝴蝶蘭的葉片厚而多肉(圖 4.2A、B)，具有多層且富含葉綠體的葉肉細胞(mesophyll cell)，其葉肉細胞並無像一般植物有柵狀組織(palisade tissue)與海綿組織(spongy tissue)之分。大部分蘭科植物為平行脈，葉片中間為中肋(midrib)縱貫於中心(圖 4.2C)，主脈再分出小葉脈，維管束經 TBO 染色後可清楚看到外木環生的木質部，中間顏色很淡的部分為韌皮部(圖 4.2C)。而上下表皮覆有突出乳頭狀的角質層(cuticle)(圖 4.2D)，角質層外部可能具有厚的蠟質(wax)。

利用正立螢光顯微鏡照射不同能量波長的光線，可激發出不同較低能量波長的螢光，再經過特殊濾片可觀察生物體的螢光物質。利用螢光顯微鏡觀察蝴蝶蘭的根部中柱，照射能量較高、波長較短(325-375 nm)的光線時，可激發波長約 435-485 nm 的藍紫色螢光(圖 4.3C)，照射波長較長的光線時(510-560 nm)，可激發波長約 574-648 nm 的紅色螢光(圖 4.3D)。而當照射波長 460-500 nm 的光線時，接收波長 510-560 nm 範圍內的螢光，可觀察到蝴蝶蘭的根部發出綠螢色光，綠色螢光相對於藍紫色螢光、紅色螢光，可最清楚看到內皮層與木質部等細胞加厚現象(圖 4.3E)，另外照射相同波長(460-500 nm)光線時，可接收波長大於 665 nm 的螢光，主要可用來觀察葉綠體之分布(圖 4.3F)，位於螢光影像上隨機分布的小亮點處。圖 4.3A 為各種螢光影像與明視野(bright field)(圖 4.3B)一起組合起來的圖片。而蝴蝶蘭的一些根部組織如木質部、內皮層、外皮層細胞壁的木質化和木栓化，在螢光顯微鏡下不需染色即可自發螢光，因此可明顯區分出內皮層、外皮層上的長細胞與通過細胞，長細胞會發出一圈一圈輪廓清楚的綠色螢光，通過細胞因細胞壁無特別加厚，因此於螢光影像上沒有從細胞壁發出的綠色螢光輪廓(圖 4.4)。因此，本試驗中以此辨別細胞形態並進一步計算此兩種細胞的個數。



## 二、缺磷對蝴蝶蘭形態構造的影響

當蝴蝶蘭 *Phal. Sogo Yukidian* 'V3' 中苗缺乏磷肥 22-23 週後，與對照組(正常施肥處理)比較其根部由根尖往上量 1、3、5 cm 位置的橫切面。結果顯示，由切片外觀上無法看出明顯的差異(圖 4.5)，缺磷下的根部皮層細胞、大小相較於對照組無差異。利用正立顯微鏡放大中柱部分(圖 4.6)，可看到蝴蝶蘭根部 1、3、5 cm 位置切面中柱的成熟度不同，於 1 cm 位置的內皮層發育尚未成熟，加厚現象不明顯(圖 4.6A、B)，5 cm 位置的內皮層細胞壁已明顯加厚，且由早成木質部往外放射處可看到通過細胞，木質部及髓部的木質化現象明顯(圖 4.6E、F)。顯示蝴蝶蘭新鮮的根部靠近根尖 5 cm 內，其細胞的分化、加厚現象、成熟度已有明顯差異。接著比較缺磷處理對蝴蝶蘭根部解剖形態的影響，於外觀上可觀察到缺磷下根部 1、3、5 cm 位置的中柱皆小於對照組(圖 4.5、4.6)，實際量化面積的結果，結果為根部面積(根被以內的面積)在 1、3、5 cm 位置皆無差異，中柱面積在 1、3 cm 位置有顯著差異。在 1 cm 位置處，缺磷下的中柱面積僅有  $0.38 \text{ mm}^2$ ，顯著小於對照組的中柱面積  $0.56 \text{ mm}^2$ (表 4.1)。然而，因為根部樣本在相同栽培條件下，儘管已經限制取樣條件為總長度小於 15 cm 的根，並限定切片位置，但實際上每條根的粗細仍有差異，因此每個處理下的樣本間差異大，所以將中柱面積除以根部面積，計算中柱面積百分比，結果顯示，缺磷下的中柱面積佔根部面積的 2.4%，顯著低於對照組中柱面積比 3.5%，而在 3 cm 位置處，缺磷下的中柱面積 ( $0.59 \text{ mm}^2$ ) 仍顯著低於對照組( $0.78 \text{ mm}^2$ )，但中柱面積比例無差異(表 4.1)。5 cm 位置處，無論中柱面積或面積比例皆無差異。然而，根部的任何位置，缺磷處理下的中柱面積及面積比的平均值皆低於對照組，表示缺磷會造成蝴蝶蘭根部中柱縮小(表 4.1)。

接著比較中柱內的維管束(vascular bundle)面積差異，在 1 cm 位置處，缺磷下的維管束面積僅  $0.2 \text{ mm}^2$ ，顯著小於對照組的維管束面積  $0.3 \text{ mm}^2$ ，而在 3、5 cm 位置處，維管束面積則無差異。當維管束面積除以中柱面積時，比較相同中柱單位面積下，缺磷對維管束面積比例的影響，結果顯示，不管在 1、3、5 cm 位置處，

維管束面積比例皆無差異，但缺磷處理下平均值皆小於對照組，顯示缺磷不僅造成中柱發育受阻、面積減小，也影響中柱內的維管束面積較對照組小(表 4.1)。另外，將根被與皮層面積(根部減中柱面積)除以中柱面積，比較皮層與中柱比，在 1 cm 位置，對照組之皮層/中柱比為 42.1，缺磷之皮層/中柱比為 28.6，在 5 cm 位置，對照組之皮層/中柱比為 31.6，缺磷之皮層/中柱比為 26.9，顯示缺磷導致蝴蝶蘭根部之皮層發育減緩、受阻(表 4.1)。

另外，蝴蝶蘭根部的外皮層與內皮層上具有長細胞和通過細胞，可能與養分的吸收有關。因此觀察缺磷是否會影響造成長細胞與通過細胞的分化數目，由表 4.2 結果顯示，在顯微鏡有限的視野下，比較外皮層上通過細胞佔外皮層總細胞的比例，僅在根部 1 cm 位置有顯著差異，對照組外皮層上的通過細胞佔 24.8%，缺磷僅佔 16.8%，但在根部 3、5 cm 位置上則無差異。比較內皮層上通過細胞、長細胞個數及通過細胞佔內皮層總細胞的比例，無論是在根部 3、5 cm 位置上，對照組的通過細胞、長細胞個數皆多於缺磷處理，顯示缺磷導致細胞數減少，但通過細胞佔內皮層細胞(通過細胞加上長細胞)的比例則無差異(表 4.2)。綜合內皮層與外皮層結果顯示，缺磷並無造成內皮層、外皮層上兩種細胞分化比例改變。而缺磷處理對蝴蝶蘭根部最顯著的影響在於維管束數目，對照組在根部 1、3、5 cm 位置，中柱內分別有 18.1、18.7、20.7 個維管束(表 4.2)，且隨著由根尖往上成熟處，維管束數目增加，但缺磷處理下，中柱內僅分別有 16.0、17.3、18.0 個維管束，顯示缺磷影響蝴蝶蘭根部內維管束減少，由圖 4.6 切片外觀也可觀察出此現象。

另外，比較缺磷與對照組下蝴蝶蘭葉片形態解剖的差異，從外觀上觀察第一片成熟葉葉片的橫切面，上下表皮厚度、葉肉細胞大小、葉綠體數目與分布等，並無觀察到明顯的差異(圖 4.7)，而第一片成熟葉葉片厚度、中肋維管束長度及面積皆無差異(表 4.3)，對照組的中肋面積平均為  $0.048 \text{ mm}^2$ ，缺磷下的中肋面積平均為  $0.046 \text{ mm}^2$ 。



## 討論



蝴蝶蘭為一種附生性蘭花作物，附生蘭花被指出具有特殊且精巧的器官或組織(Benzing et al., 1983)。新鮮切片為一個簡單快速且可清楚觀察蝴蝶蘭組織結構的方法，TBO 可以分別將木質化的管胞、導管、厚壁組織等染成藍綠色，薄壁細胞、厚角組織或篩管則呈現紫紅色(O'Brien et al., 1964)，因此可分辨不同的組織結構，另外藉由木質化組織具自發螢光之特性，可更進一步地觀察外皮層與內皮層上的特化細胞(Brundrett et al., 1988; Peterson and Enstone, 1996)。

蝴蝶蘭的外層為表皮細胞特化而成的根被組織，蝴蝶蘭臺灣阿嬤(*Phal. amabilis*)具 2-3 層根被(Benzing et al., 1983; Pridgeon, 1987)。本試驗中 *Phal. Sogo* Yukidian 'V3' 則具有 2 層根被(圖 4.1D-F)，在根部的根尖往上 1 cm 位置即可觀察到表皮細胞不規則加厚形成的根被構造(圖 4.5A、B)。根被扮演類似海綿之功能，使根部具有將水分與礦物營養暫時固定於根被組織中(Benzing et al., 1982; Moreira and Isaias, 2008)。當蝴蝶蘭根被被剝除後，礦物營養中帶電離子則會快速流失(Zotz and Winkler, 2013)，因此，根被組織具快速吸水及保留養分之功能。但養分吸收效率並非與根被層數目呈正相關，附生蘭本身可能因物種本身特性，較地生蘭具高的養分吸收效率(Hew et al., 1993)。

蝴蝶蘭的外皮層與內皮層上具有兩種形態的細胞(Benzing et al., 1983; Moreira and Isaias, 2008; Oliveira and Sajo, 1999)，一種為長細胞(long cell)，在內皮層上呈現 O 型加厚(圖 4.4A、B)，在外皮層上呈現 U 型加厚(圖 4.4C、D)，外側之內切細胞壁加厚較嚴重，經 TBO 染色或螢光照射，可看到其細胞壁木質化的輪廓，且因具有木栓化的二次細胞壁，被認為水分進出根部的阻礙，具有調控水分吸收的功能(Benzing et al., 1983; Moreira and Isaias, 2008; Pridgeon, 1986)，以及避免細胞內礦物離子回流離開根部(Enstone et al., 2002; Peterson and Enstone, 1996)。另外一種為短細胞(short cell)，又稱通過細胞(passage cell)，細胞壁無木質化現象，在外皮層上，

相較於其他木質化的根被及長細胞，通過細胞具有活性的細胞膜，並貼近土壤介質，可能具有幫助養分吸收之功用。在內皮層上，其分布位置明顯靠近於早成木質部(圖 4.1C)，位於木質部的向外放射處，可能具有降低水分運輸阻力、幫助礦物離子快速進入木質部之功用(Peterson and Enstone, 1996)。李和李(1981)在研究報告中指出，蝴蝶蘭 *Phalaenopsis amabilis* 的通過細胞與維管束的韌皮部相對，此結論與本試驗不符，查看其研究報告的圖片結果，我推測原作者可能對蝴蝶蘭根部的木質部、韌皮部的標示有誤，通過細胞同樣位於早成木質部的向外放射處。

蝴蝶蘭的氣生根在長期演化下，可能面臨原生環境水分與營養供給不穩定的逆境，因此根部演化出上述的特化組織，具有快速吸水、防止水分蒸散、且高效率運輸之特性，使蝴蝶蘭對於養分的吸收與利用具有非常高的效率，並能在養分貧瘠之環境下生存。

當植物面對缺磷的環境時，會透過改變根部形態及結構，提高自身對磷的吸收效率，例如在缺磷環境下阿拉伯芥 *Arabidopsis thaliana* 會抑制其主根伸長、促進側根及根毛生長(Bates and Lynch, 1996; Péret et al., 2011; Williamson et al., 2001); 白羽扇豆(*Lupinus albus* L.)自周鞘(pericycle)分化形成了大量且密集的簇生根(proteoid root) (Johnson et al., 1996; Lamont, 2003; Peek et al., 2003)，在石灰性缺磷的土壤中，簇生根會主動向外分泌大量的檸檬酸導致根際酸化(Dinkelaker et al., 1989); 或是，植物發展出與囊叢枝內生菌根菌(vesicular-arbuscular mycorrhizal, VAM)共生，藉由菌根增加與土壤接觸的面積、溶解土壤中的磷以及使磷在菌絲裡移動更快速，以獲取不易移動的磷肥(Bolan, 1991; McArthur and Knowles, 1993)。另外，當玉米(*Zea mays* L.)的不定根遭遇缺磷逆境時，會造成玉米對於乙烯的敏感度提高，繼而促進皮層細胞裂解使通氣組織(aerenchyma)面積增大(He et al., 1992)。

除了上述中植物於缺磷逆境下所發展出的根部形態特性外，目前對於缺乏磷元素對植物解剖構造的影響之相關前人研究很少。本試驗中，蝴蝶蘭 *Phal. Sogo*



Yukidian ‘V3’在缺磷 22-23 週後，從外觀上觀察根部與葉片的新鮮切片，缺磷與對照組相比下並無明顯的差異。進一步量化數據後，缺磷會造成蝴蝶蘭根部中柱與維管束面積平均值減小，並在由根尖往上 1 cm 處，此現象有顯著差異(表 4.1)，但隨著切片組織越成熟(5 cm 處)，雖然平均值較低，但統計上無差異。另外，根部維管束數目無論在由根尖往上 1、3、5 cm 位置處，皆顯著地較對照組減少(表 4.2；圖 4.6)，此現象為本試驗中蝴蝶蘭在缺磷下解剖構造上差異最大的部分，推測缺磷可能會造成根部中柱組織發育受阻，並使根部組織生長速度減緩。玉米(*Zea mays* L.)從種子開始種植後，缺磷 28 天，玉米的根部直徑減小、皮層面積減少，木質部導管(xylem vessel)數目減少、早成木質部(protoxylem)的空腔縮小(Sarker et al., 2010)。而本試驗中蝴蝶蘭其早成木質部的空腔大小則無差異。另外，長豇豆(*Vigna unguiculata* W. ssp. *sesquipedalis* L.)幼苗於缺磷下，根直徑與髓部直徑變小(Liu et al., 2004)。從以上結果顯示，缺磷會造成蝴蝶蘭與其他植物如玉米、長豇豆維管束分化受阻、數目減少。Sarker 等(2010)的試驗中指出，缺磷造成玉米根部表皮細胞變厚、內皮層細胞縮小且加厚。但本試驗中無觀察到此現象，蝴蝶蘭根被層數不變(圖 4.5)，內皮層加厚現象不受缺磷影響，主要隨組織越成熟而越厚(圖 4.6)。

在葉片形態解剖方面，缺磷會造成玉米的葉肉組織厚度減少、細胞變小，同時，使得葉片中維管束面積縮小(Sarker et al., 2010)；而黃豆(*Glycine max* [L.] Merr. cv. Ransom)從種子播種後開始缺磷 32 天，2 週後新葉發育(leaf initiation)受抑制，雖然表皮細胞大小無受到影響，但缺磷下的葉片厚度減小，因為柵狀葉肉細胞(palisade mesophyll)、海綿葉肉細胞(spongy mesophyll)所占面積厚度減小，且在嚴重缺磷 28 天後，莖部頂端生長點(shoot apical meristem)細胞雖然完整無損，但缺磷可能已經造成細胞分化受到阻礙(Chiera et al., 2002)。菜豆(*Phaseolus vulgaris*)缺磷時，其葉片柵狀組織、海綿組織單位面積下細胞數增多，排列緊密，並發生有收縮、變形現象，致使葉綠素密度相對提高(Wang et al., 1999)。本試驗中，蝴蝶蘭 *Phal.* Sogo Yukidian ‘V3’在缺磷 22-23 週後，葉片於解剖外觀上無明顯差異，缺磷

沒有造成葉肉細胞厚度減小或細胞間隙變緊密，細胞皆充實飽滿、輪廓清晰，木質部與韌皮部形態無顯著差異(圖 4.7)，而無論是維管束面積、葉片厚度經數據量  
化後均無差異(表 4.3)，從此結果可以看出蝴蝶蘭對於缺磷逆境具有極高的耐受性，  
缺乏磷肥長達 22-23 週，葉片的結構並無受到太大的影響。

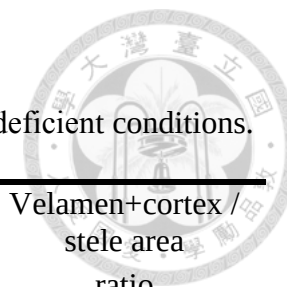


表 4.1. 蝴蝶蘭於正常施肥與缺磷處理下的根部、中柱、維管束面積

Table 4.1. The area of root, stele, and vascular bundle in *Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3' under normal or phosphate deficient conditions.

| Fertilizer treatment and section position | Root area (mm <sup>2</sup> ) | Stele area (mm <sup>2</sup> ) | Stele/ root area (%) | Vascular bundle area (mm <sup>2</sup> ) | Vascular bundle / stele area (%) | Velamen+cortex / stele area ratio |
|-------------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|----------------------|-----------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| <b>1 cm</b>                               |                              |                               |                      |                                         |                                  |                                   |
| Control (+NPK)                            | 16.41 a <sup>z</sup>         | 0.56 a                        | 3.5 a                | 0.30 a                                  | 53.0 a                           | 42.1                              |
| 0P                                        | 16.20 a                      | 0.38 b                        | 2.4 b                | 0.20 b                                  | 53.4 a                           | 28.6                              |
| Significance <sup>y</sup>                 | NS                           | ***                           | **                   | *                                       | NS                               |                                   |
| <b>3 cm</b>                               |                              |                               |                      |                                         |                                  |                                   |
| Control (+NPK)                            | 26.59 a                      | 0.78 a                        | 3.0 a                | 0.47 a                                  | 60.7 a                           | 39.2                              |
| 0P                                        | 22.87 a                      | 0.59 b                        | 2.5 a                | 0.39 a                                  | 66.1 a                           | 33.4                              |
| Significance                              | NS                           | *                             | NS                   | NS                                      | NS                               |                                   |
| <b>5 cm</b>                               |                              |                               |                      |                                         |                                  |                                   |
| Control (+NPK)                            | 24.26 a                      | 0.88 a                        | 3.7 a                | 0.49 a                                  | 55.9 a                           | 31.6                              |
| 0P                                        | 24.16 a                      | 0.77 a                        | 3.2 a                | 0.45 a                                  | 59.1 a                           | 26.9                              |
| Significance                              | NS                           | NS                            | NS                   | NS                                      | NS                               |                                   |

<sup>z</sup> Means followed by different letters within columns are significantly different at  $P \leq 0.05$  by the least significant difference test; n = 7.

<sup>y</sup> NS indicates the difference between control and 0P is not significant. The significant differences are marked as \*, \*\* or \*\*\* according to unpaired t test at  $P \leq 0.05$ , 0.01 or 0.001, respectively; n = 7.

表 4.2. 蝴蝶蘭於正常施肥與缺磷處理下，根部外皮層、內皮層的通過細胞與長細胞和中柱的維管束數目

Table 4.2. The number of passage cell, long cell in exodermis, endodermis and vascular bundle in stele of *Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3' under normal or phosphate deficient conditions.

| Fertilizer treatment and section position | Exodermis                    | Endodermis          |                  |                              | Stele                  |
|-------------------------------------------|------------------------------|---------------------|------------------|------------------------------|------------------------|
|                                           | Passage cell/ exdodermis (%) | Passage cell number | Long cell number | Passage cell/ endodermis (%) | Vascular bundle number |
| <b>1 cm</b>                               |                              |                     |                  |                              |                        |
| Control (+NPK)                            | 24.8 a <sup>z</sup>          | -                   | -                | -                            | 18.1 a                 |
| 0P                                        | 16.8 b                       | -                   | -                | -                            | 16.0 b                 |
| Significance <sup>y</sup>                 | *                            |                     |                  |                              | **                     |
| <b>3 cm</b>                               |                              |                     |                  |                              |                        |
| Control (+NPK)                            | 22.2 a                       | 31.7 a              | 105.6 a          | 23.1 a                       | 18.7 a                 |
| 0P                                        | 18.2 a                       | 27.0 a              | 88.3 a           | 24.1 a                       | 17.3 b                 |
| Significance                              | NS                           | NS                  | NS               | NS                           | *                      |
| <b>5 cm</b>                               |                              |                     |                  |                              |                        |
| Control (+NPK)                            | 17.1 a                       | 24.8 a              | 128.0 a          | 16.4 a                       | 20.7 a                 |
| 0P                                        | 19.4 a                       | 20.0 b              | 108.5 a          | 15.7 a                       | 18.0 b                 |
| Significance                              | NS                           | *                   | NS               | NS                           | **                     |

<sup>z</sup> Means followed by different letters within columns are significantly different at  $P \leq 0.05$  by the least significant difference test; n = 7.

<sup>y</sup> NS indicates the difference between control and 0P is not significant. The significant differences are marked as \*, \*\* or \*\*\* according to unpaired t test at  $P \leq 0.05, 0.01$  or  $0.001$ , respectively; n = 7.

表 4.3. 蝴蝶蘭於正常施肥與缺磷處理下，第一片成熟葉葉片厚度、中肋維管束長度及面積

Table 4.3. The thickness of leaf, the length and area of vascular bundle in the midrib of 1<sup>st</sup> mature leaf of *Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3' under normal or phosphate deficient conditions.

| Fertilizer treatment      | Leaf thickness (mm) | Vascular bundle length (mm) | Vascular bundle area (mm <sup>2</sup> ) |
|---------------------------|---------------------|-----------------------------|-----------------------------------------|
| Control (+NPK)            | 1.28 a <sup>z</sup> | 0.396 a                     | 0.048 a                                 |
| 0P                        | 1.35 a              | 0.418 a                     | 0.046 a                                 |
| Significance <sup>y</sup> | NS                  | NS                          | NS                                      |

<sup>z</sup> Means followed by different letters within columns are significantly different at  $P \leq 0.05$  by the least significant difference test; n = 5.

<sup>y</sup> NS indicates the difference between control and 0P is not significant. n = 5.

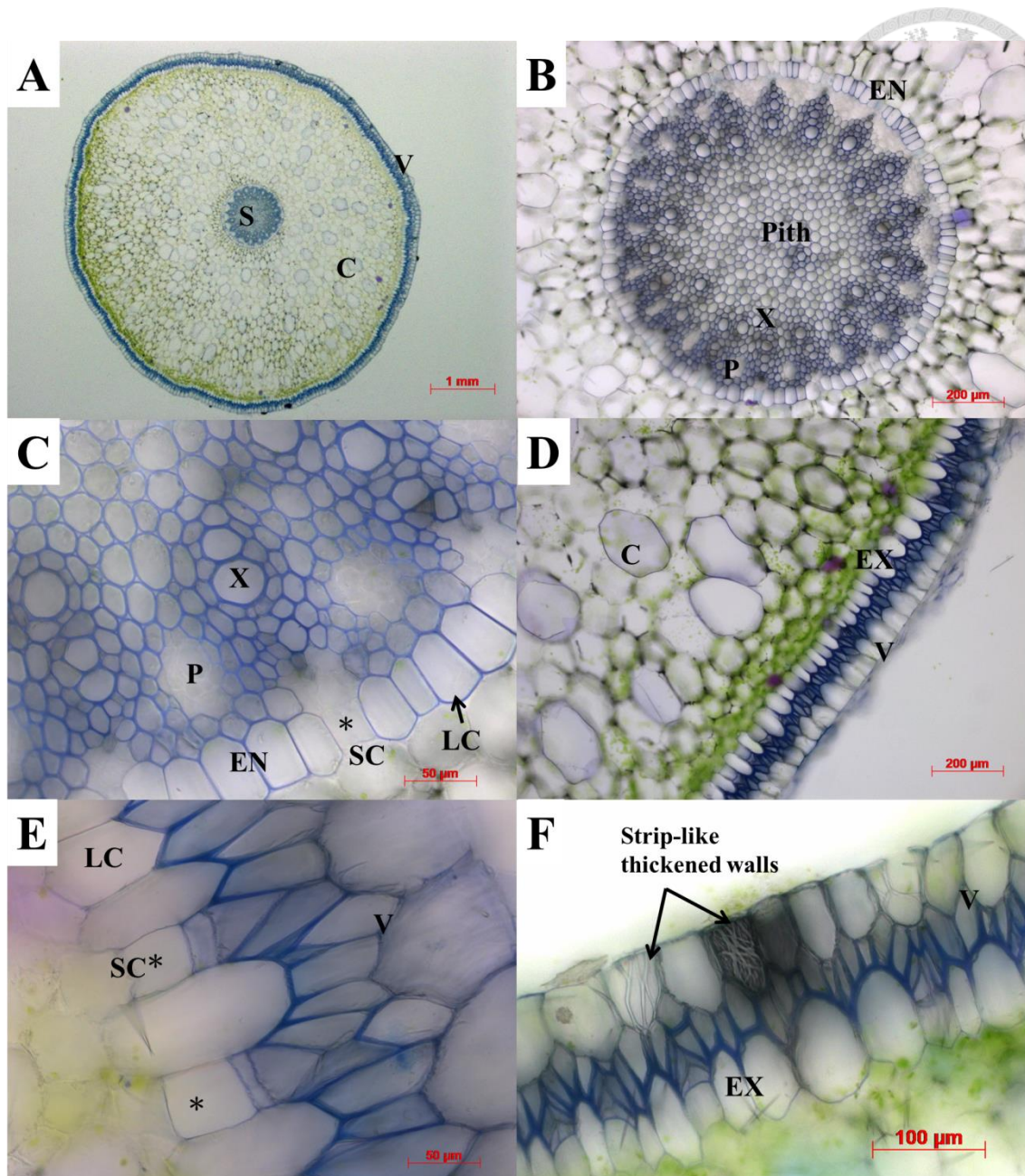


圖 4.1. 蝴蝶蘭根部之解剖構造

Fig. 4.1. Anatomy of *Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3' roots. (A) Overall view of a root cross section. Bar = 1 mm. (B) Cross section of stele showing the pith and vascular bundles. Bar = 200 µm. (C) Long cells with O-thickened walls (arrow) and short cells opposite to the protoxylem arches in endodermis. Short cell is also called passage cell(\*) Bar = 50 µm. (D) The outermost surface of the root is velamen, following is exodermis and cortex. Bar = 200 µm. (E) The velamen is subtended by an exodermis which consist of long cells with U-thickened walls and short cells. Bar = 50 µm. (F) The covering layer of the root is the velamen, a multiseriate epidermis consisting of dead cells with modified walls. There are strip-like thickened walls in some cells of velamen. Bar = 100 µm. V, velamen; S, stele; C, cortex; X, xylem; P, phloem; EN, endodermis; EX, exodermis; LC, long cell; SC, short cell.



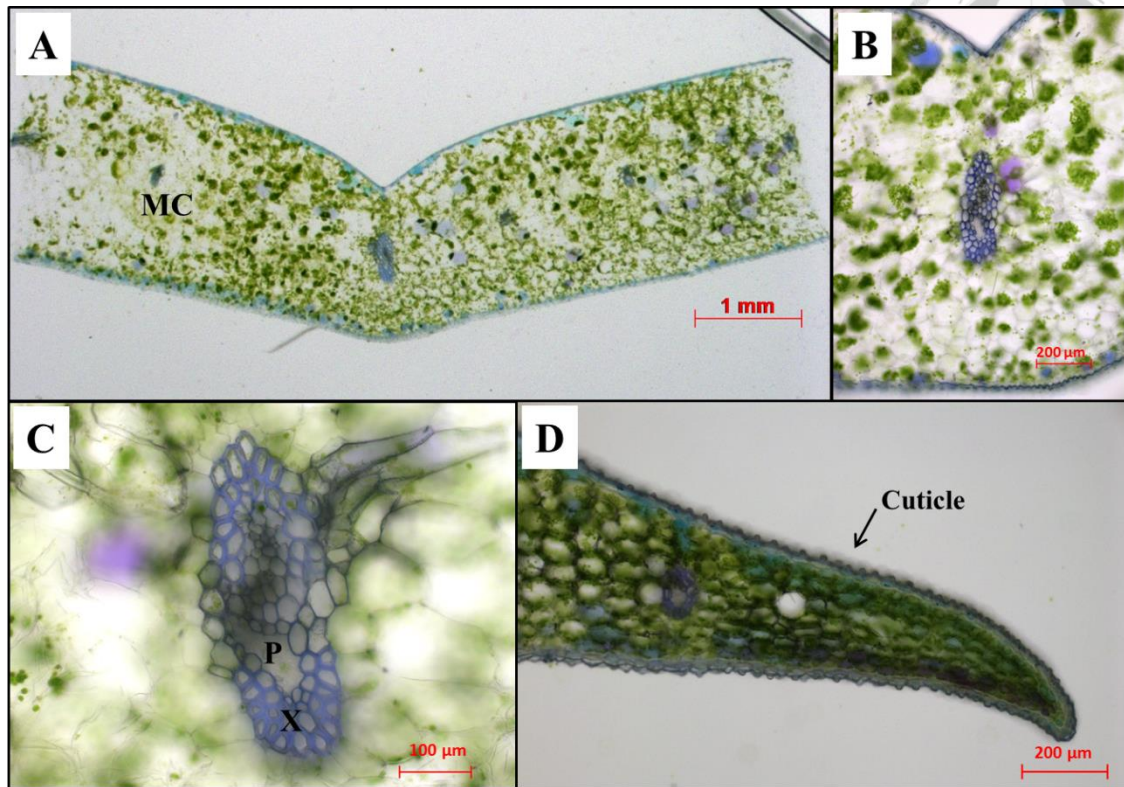


圖 4.2. 蝴蝶蘭葉片之解剖構造

Fig. 4.2. Anatomy of *Phalaenopsis Sogo Yukidian* 'V3' leaves. (A) Overall view of the leaf cross section. Bar = 1 mm. (B) The midrib and mesophyll cells in leaf. Bar = 200 μm. (C) Enlarged midrib. Bar = 100 μm. (D) There are cuticles (arrow) in the adaxial and abaxial of the epidermis in leaf. Bar = 200 μm. MC, mesophyll cells; X, xylem; P, phloem.

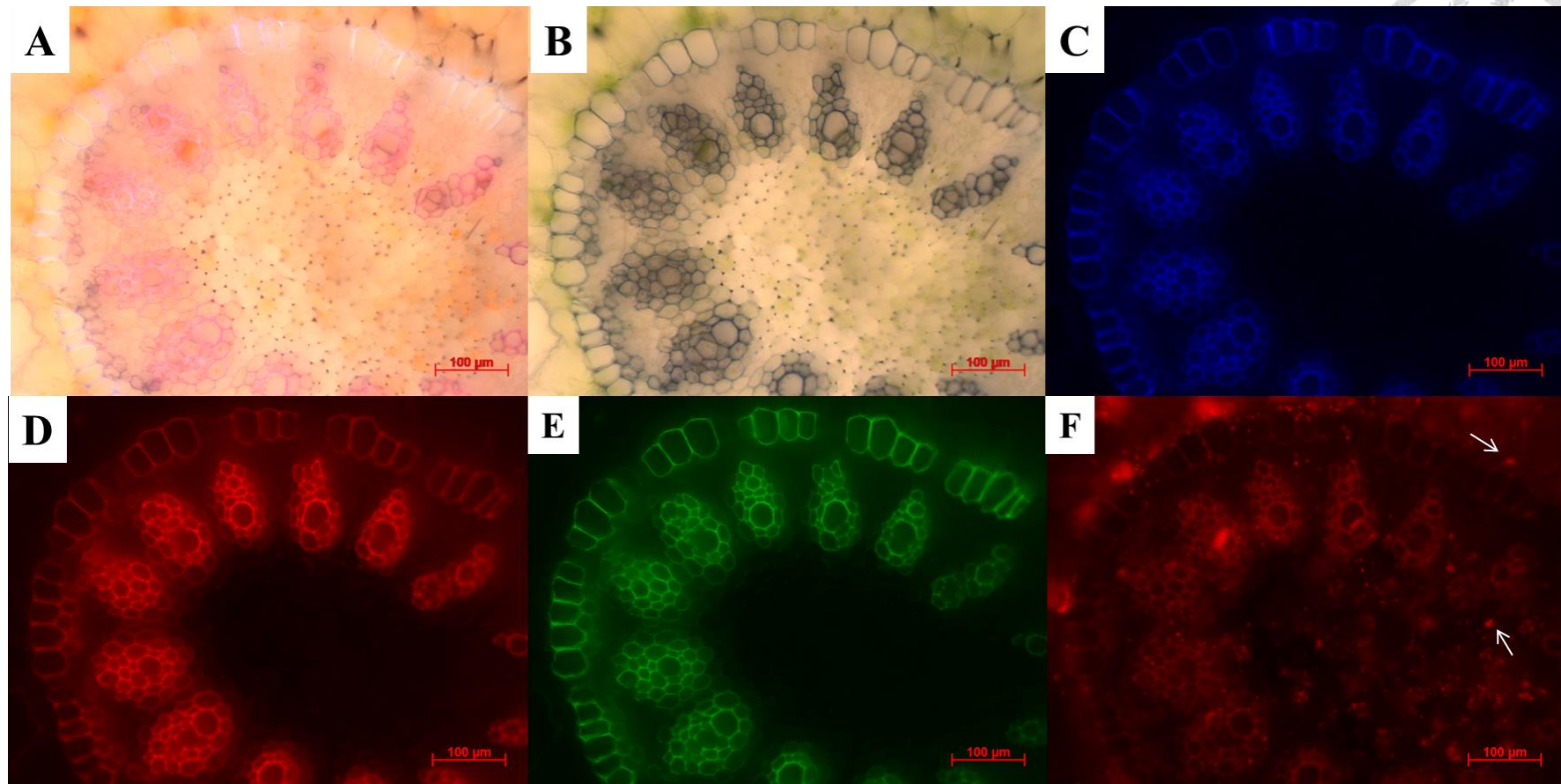


圖 4.3. 蝴蝶蘭根部之新鮮切片於不同波長螢光觀察下之影像

Fig. 4.3. The images of fresh root sections of *Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3' under bright field or different fluorescence. (A) Combined image. (B) Bright field (C) DAPI wavelength: 325-375 nm (D) RFP wavelength: 510-560 nm (E) GFP wavelength: 460-500 nm (emission wavelength: 510-560 nm) (F) GFP wavelength: 460-500 nm (emission wavelength: >510 nm). Some small highlights (arrows) in images were chloroplasts. Bar = 100 µm.

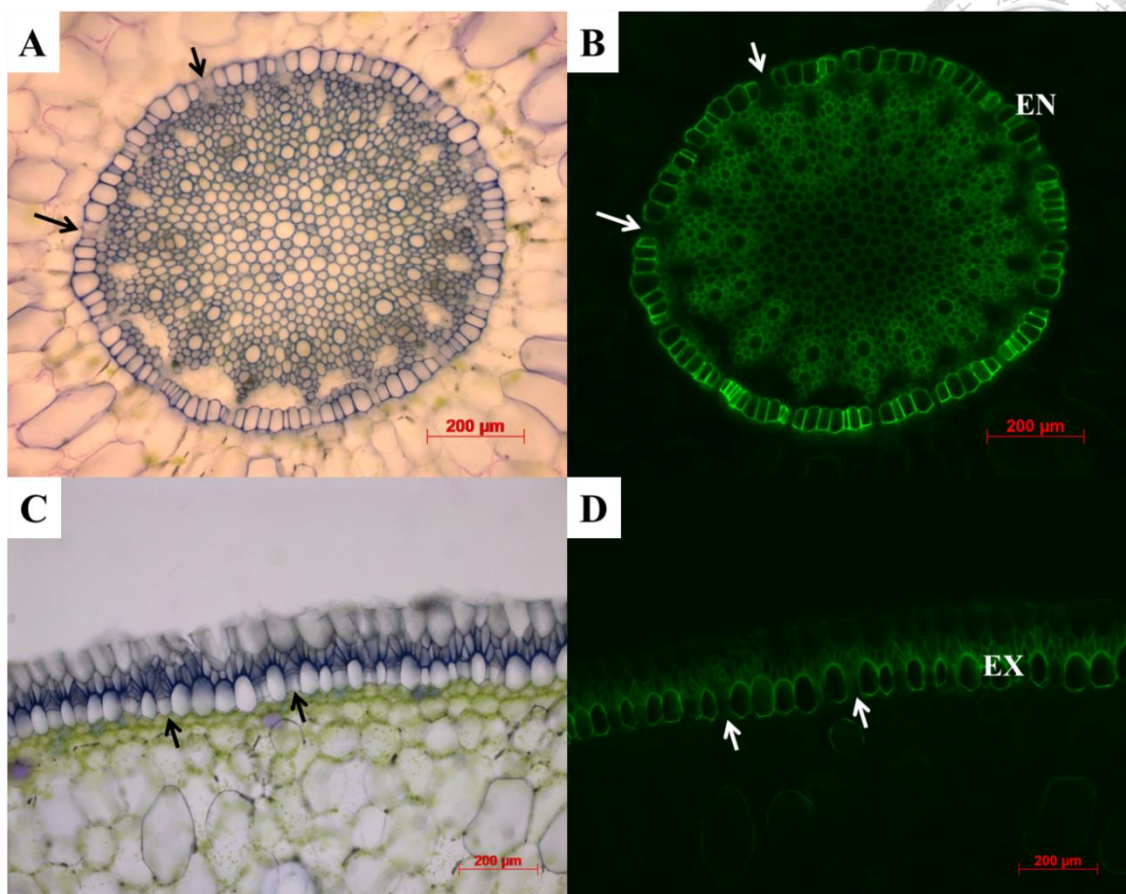


圖 4.4. 蝴蝶蘭外皮層與內皮層之長細胞與通過細胞

Fig. 4.4. Anatomy of root endodermis (A and B) and exodermis (C and D) of *Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3'. Cross sections stained with toluidine blue O and observed with light microscope (A and C). The thick lignified walls of long cells were viewed under ultraviolet light (B and D). Autofluorescence observed with UV illumination is due to the presence of lignin and suberin lamellae. This is absent in passage cells (arrow). Bar = 200  $\mu$ m.



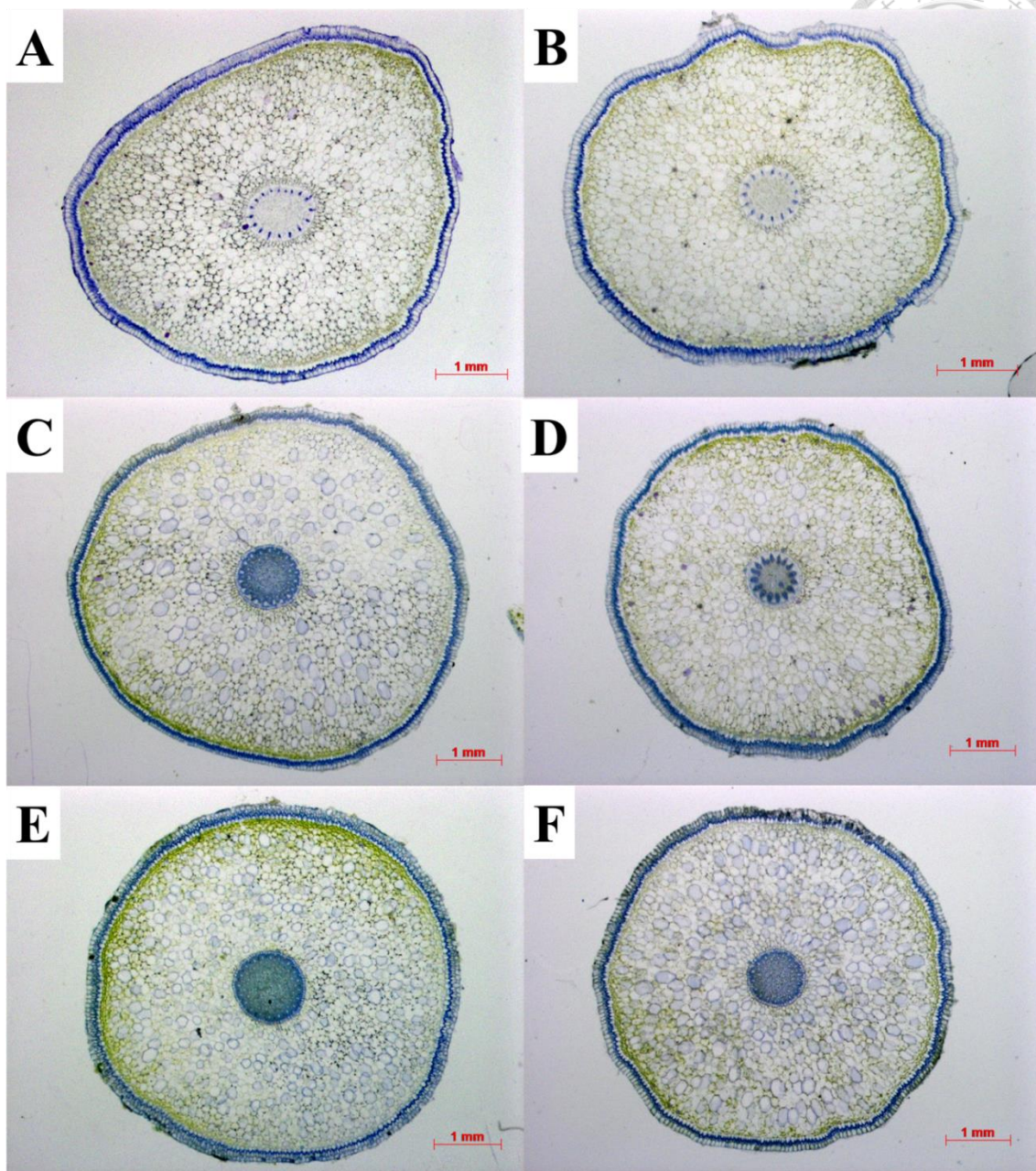


圖 4.5. 以解剖顯微鏡觀察，蝴蝶蘭於正常施肥與缺磷下，根部分別自根尖往上 1 公分、3 公分、5 公分之橫切面

Fig. 4.5. Cross sections of *Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3' root at the position 1, 3, or 5 cm away from root tip grown under normal (+NPK) or phosphate deficient (-P) conditions. The sections were viewed under stereomicroscope. (A) 1 cm, under +NPK; (B) 1 cm, under -P; (C) 3 cm, under +NPK; (D) 3 cm, under -P; (E) 5 cm, under +NPK; (F) 5 cm, under -P. Bar = 1 mm.



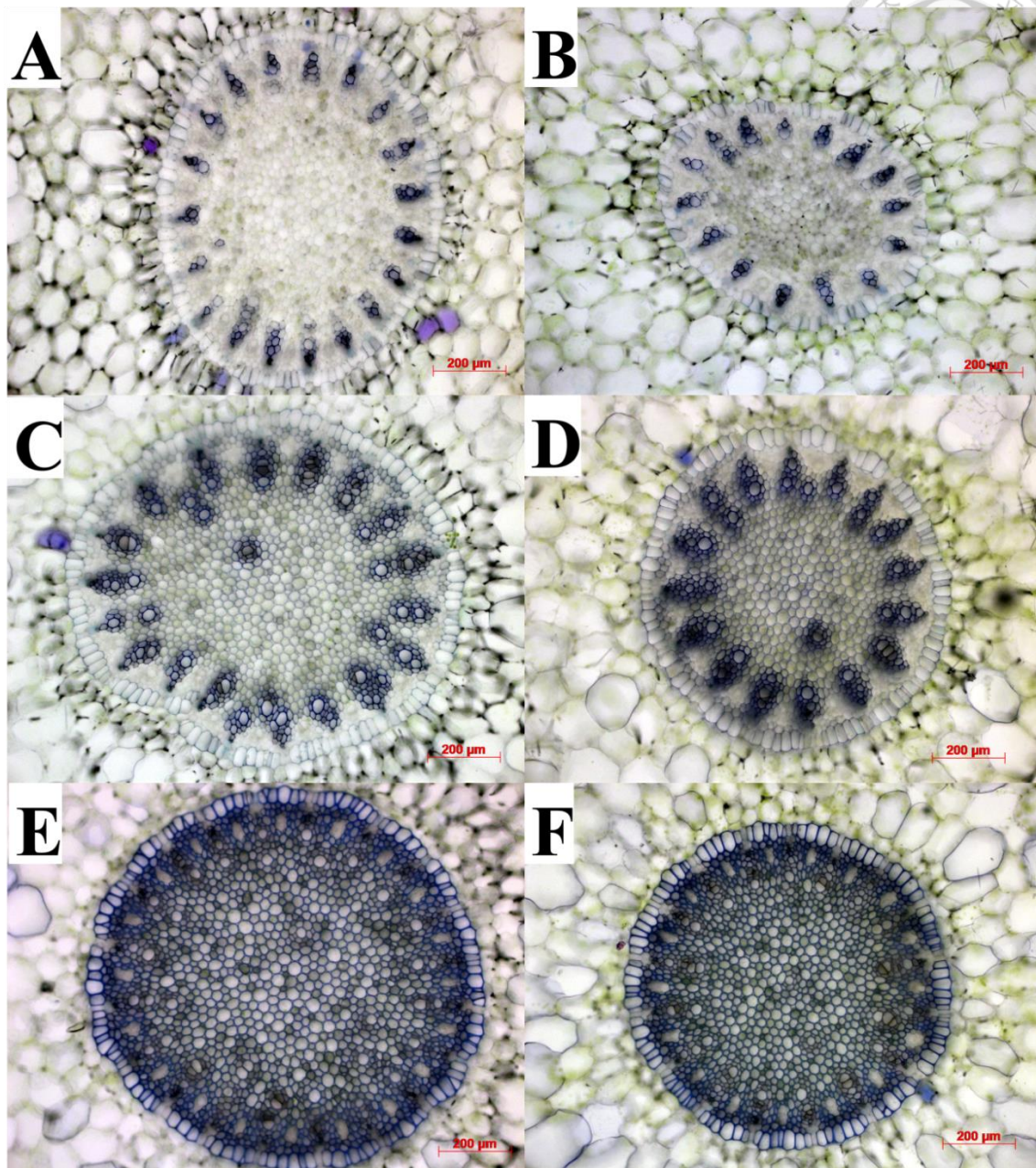


圖 4.6. 以正立光學顯微鏡觀察，蝴蝶蘭於正常施肥與缺磷下，根部分別自根尖往上 1 公分、3 公分、5 公分之中柱橫切面

Fig. 4.6. Cross sections of *Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3' root stele at the position 1, 3, or 5 cm away from root tip grown under normal (+NPK) or phosphate deficient (-P) conditions. The sections were viewed under light microscope. (A) 1 cm, under +NPK; (B) 1 cm, under -P; (C) 3 cm, under +NPK; (D) 3 cm, under -P; (E) 5 cm, under +NPK; (F) 5 cm, under -P. Bar = 200  $\mu$ m.

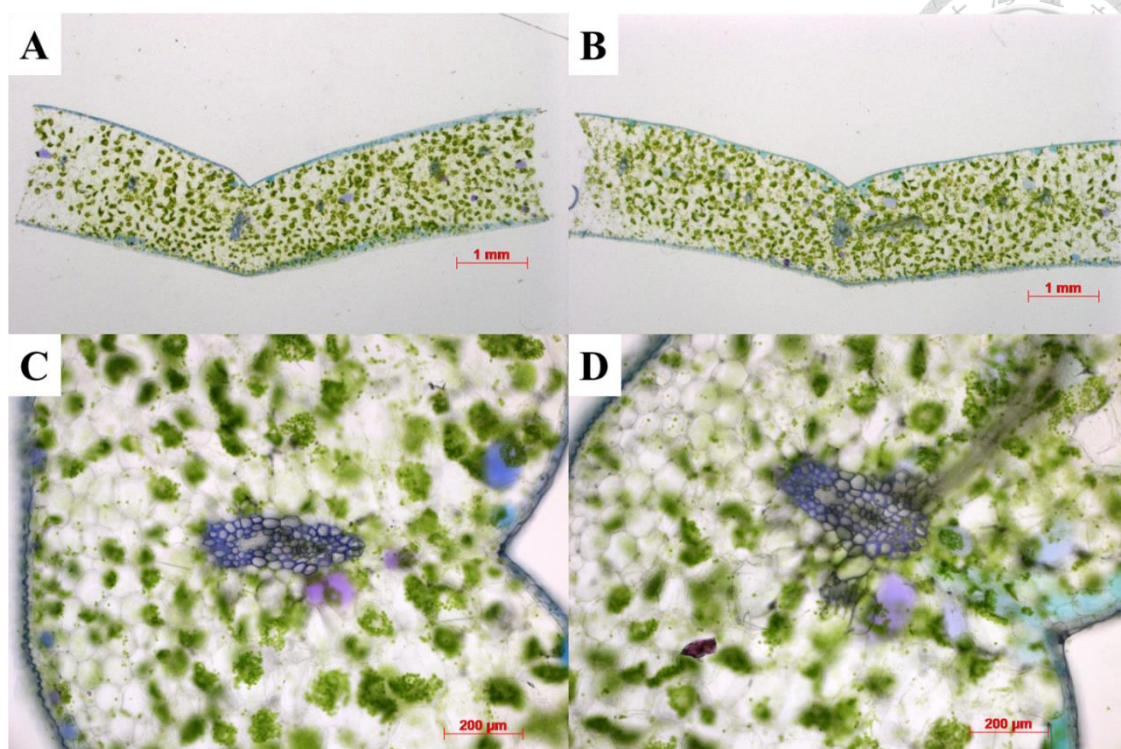


圖 4.7. 蝴蝶蘭於正常施肥與缺磷下，第一片成熟葉的中肋之橫切面

Fig. 4.7. Cross sections of leaf of *Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3' under normal (+NPK) or phosphate deficient (-P) conditions, which were viewed under light microscope. Overall view of leaf under +NPK (A) or -P (B). Midrib of leaf under +NPK (C) or -P (D). Bar = 1 mm or 200 μm.





## 第五章 蝴蝶蘭於缺磷下的基因表現

### 摘要

磷是植物生長與發育所必須的大量元素，當植物面對養分不均衡時，會藉由調控基因表現及改變其內部訊號傳遞來面對逆境。本試驗為了瞭解蝴蝶蘭 *Phalaenopsis Sogo Yukidian* 'V3' 於缺磷逆境下的基因表現，分別給予植株不同濃度的磷肥(0、0.16、1.61 mM)的肥料處理 8 週及 12 週，並自先前微矩陣分析的結果中挑選 37 個蝴蝶蘭於缺磷下明顯表現改變的基因，利用反轉錄聚合酶連鎖反應加以驗證。大部分葉片中的上調基因可以被驗證，其中以 PATC128122 於缺磷下增加表現量的現象最明顯，但葉片中下調基因無法被確認；根部中的上調基因與下調基因亦無法被驗證，基因於缺磷植株下的表現量與對照組無差異。其中，PATC128122 蛋白質上具 RING 功能區塊，對於缺磷具專一性反應，不受缺氮、缺鉀所誘導，並顯著於缺磷 12 週後在蝴蝶蘭的葉片和根部內提高表現。原位雜交結果顯示 PATC128122 表現位置為根部的皮層細胞、葉片主脈的韌皮部。為了瞭解 PATC128122 的功能，利用含兩倍花椰菜嵌紋病毒 35S 啟動子的載體大量表現 PATC128122 於阿拉伯芥內，發現 35S::PATC128122 轉植株栽種於不同磷濃度(250、50、10  $\mu\text{M}$  Pi)的條件下，其轉植株的鮮重、無機磷濃度與外觀皆與野生型植株沒有差異。

### 前言

蝴蝶蘭為附生性植物，對於養分缺乏具有極高的耐受性，可能與其光合作用型態為 CAM 型，植株生長緩慢；或在器官的構造上具有一些特化的組織如根被，幫助其快速吸收養分、避免流失養分；或是因為具有肥厚的根與葉片可貯存養分

有關(Susilo and Chang, 2014; Zotz and Hietz, 2001; Zotz and Winkler, 2013)。另一方面，蝴蝶蘭也可能在其本身內部的生理生化、分子層面的調控上，包含對於養分的吸收、運移、貯存、養分分配上具有特殊的機制，且別於一般模式物種如阿拉伯芥、水稻等。

目前蘭花的基因功能研究較少，可能與其非主流模式作物、生命週期長、基因轉殖系統相對困難或基因體庫資料尚不健全有關，近幾年國內已陸續建構蘭花基因表達資料庫，如 Orchidstra 或 OrchidBase 2.0 (Su et al., 2011; Tsai et al., 2013)。相關研究以花朵形態、顏色、香味等居多，但幾乎無蝴蝶蘭與養分獲取與運用相關的分子研究。游(2012)以缺乏不同濃度的氮、磷、鉀處理大白花蝴蝶蘭 *Phal. Sogo Yukidian* 'V3'，儘管缺肥處理 8 週，蝴蝶蘭於外觀上不會顯現任何養分不足徵狀，但以微矩陣(microarray)生物晶片技術可偵測到大量的基因產生變化，但微矩陣的資料結果很龐大，需再進一步以其他技術進行驗證。

磷為植物生長與繁衍所必需的重要元素，且蝴蝶蘭於生殖生長期面臨缺磷逆境可能導致抽梗率降低(游，2012; Yoneda et al., 1997)。植物在土壤中主要吸收無機磷，但磷在土壤中常被固定而導致植物獲取不易，因此一般栽培上需要施加磷肥補充，但磷肥開採自有限的磷礦石，因此，瞭解植物在缺磷逆境下的分子調控機制將可提供未來永續農業發展之重要資訊。

因此本試驗主要從游(2012)微矩陣資料中，挑選數個缺磷逆境下的表現基因做進一步地驗證，除了驗證微矩陣資料的正確性，並期望從中挑選出蝴蝶蘭特別於缺磷逆境下表現的基因作功能性的探討。

## 材料方法

### 試驗材料

#### 1. 蝴蝶蘭

蝴蝶蘭表現基因驗證的試驗中，使用的植物材料為《第三章 蝴蝶蘭於養分逆



境下的生長反應》缺乏氮、磷、鉀處理 8、12 週之蝴蝶蘭 *Phalaenopsis Sogo Yukidian* ‘V3’，其中試驗總共重複 4 次，分別於 101 年 10 月 7 日(Experiment 1, Expt. 1)、29 日(Expt. 2)及 11 月 5 日(Expt. 3)、9 日(Expt. 4)進行換盆，每個試驗重複下各處理 3 棵植株，主要取其中正常施肥(+NPK)、低磷(0.1P)、缺磷(0P)處理下的植物，進行無機磷濃度測定與表現基因驗證。植物栽培於中央研究院基因體中心日夜溫 30/25 °C、自然光照的人工氣候室。

原位雜交分析兩基因在蝴蝶蘭中的表現位置，使用的植物材料與《第四章 蝴蝶蘭於缺磷下的形態解剖觀察》為同一批植物。植物栽培於臺灣大學日夜溫 30/25 °C、自然光照的人工氣候室。

## 2. 阿拉伯芥

本試驗使用之阿拉伯芥(*Arabidopsis thaliana*)為 Columbia-0 之野生株和 T<sub>2</sub> 代之後的 35S::PATC128122 轉植株。植物栽培於室溫維持 22 °C、光週設定為 16 小時日照的室內生長室。

## 試驗設計

### 1. 蝴蝶蘭基因表現驗證

蝴蝶蘭 *Phal. Sogo Yukidian* ‘V3’於正常施肥(+NPK)、低磷(0.1P)、缺磷(0P)處理下 8 週、12 週，肥料處理分別施以 1.61、0.16、0 mM 之不同濃度的磷肥，各肥料處理之詳細配方參照表 3.1，植株於取樣時間點進行生理資料調查後，便以酒精消毒後的剪刀剪取蝴蝶蘭葉片及根部，葉片固定取樣由上往下數第一片成熟葉，根部為選取由根尖往上 5 cm 內的組織。將組織剪成小塊狀後，以錫箔紙包裹，迅速置於液態氮中冷卻固定，保存於-80 °C 低溫恆溫櫃中，而之後取每個試驗重複下同一處理下的 3 棵植株，將 3 棵植物的組織(葉片或根部)混合一起，進行無機磷(inorganic phosphate, Pi)濃度測定及 RNA 萃取。自微矩陣結果(游，2012)中挑選蝴蝶蘭 *Phal. Sogo Yukidian* ‘V3’葉片與根部於缺磷下反應(Fold change 倍數大於 3)的基因，以反轉錄聚合酶連鎖反應方法進行基因表現量驗證。

## 2. 以原位雜交分析 PATC128122、PATC144588 在蝴蝶蘭中的表現位置

分別以正常施肥(+NPK)及缺磷(OP)條件給予蝴蝶蘭 *Phal. Sogo Yukidian 'V3'* 共 21 週的處理，接著將蝴蝶蘭植株送至中央研究院南部生物技術中心，取樣部位為蝴蝶蘭植株由上往下數第一片成熟葉中、位置在葉片長度一半的中肋(midrib)，及盆內貼附於水苔的根(長度 < 15 cm)，取樣位置為自根尖往上測量 0.5 cm、3 cm 處，接著，將組織包埋於石蠟中，另外，以 pGEM-T 載體構築 PATC128122、PATC144588 的探針，後續組織切片及原位雜交之操作為委託南部中央研究院辜瑞雪老師實驗室協助。

## 3. 過量表現 PATC128122 於阿拉伯芥在缺磷下的反應

構築基因 PATC128122 於 pMDC32 表現載體中，pMDC 載體具 2 倍的花椰菜嵌紋病毒(*Cauliflower mosaic virus, CaMV*) 35S 啟動子，將過量表現質體以農桿菌轉殖到阿拉伯芥 *Arabidopsis thaliana* Columbia-0，接著，植物種植於中央研究院的轉殖溫室，收取第一代 T<sub>1</sub> 轉植株的種子，以 70%酒精、0.05% Triton X-100 震盪消毒 15 分鐘後，再以 95%酒精消毒 10 分鐘，播種於含有 Hygromycin B (20  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) (Sigma)的培養基中，培養基成分與濃度為修改自 Hogland's 養液配方(Millner and Kitt, 1992)，以抗生素篩選第二代 T<sub>2</sub> 植株，共種植 20 個 35S::PATC128122 轉殖品系(Transgenic lines)，收取種子並保存於 16 °C 乾燥箱中。

挑選 9 個對抗生素抗性(resistance rate)約 75%之 T<sub>2</sub> 轉殖品系(transgenic lines 1-5, 7, 8, 10, 16)，種子消毒後，播種於含有 Hygromycin B (20  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )、0.8% agar 的培養基中，先以抗生素篩選具抗性之植株，之後轉移到含不同磷濃度(250, 50 or 10  $\mu\text{M KH}_2\text{PO}_4$ )、1.2% agar 的培養基，pH 值約 5.7，培養皿為直立式栽培，另外，種植阿拉伯芥 Columbia-0 之野生株(wild type)於不含抗生素之培養基，之後同樣轉移至 3 種磷濃度條件下。此試驗重複 2 次，第一次阿拉伯芥經過抗生素篩選 7 天、不同磷濃度處理 8 天(15-day-old)，第二次阿拉伯芥經過抗生素篩選 5 天、不同磷濃度處理 6 天(11-day-old)，每處理共 5 盤培養皿，每培養皿共 10 棵 35S::PATC128122

轉植株，總共 9 個轉殖品系。試驗結束後收取野生株與轉植株之植體，進行表現型(phynotype)觀察拍照、Pi 濃度與 RNA、蛋白質層次之基因表現測量。

除了上述中生長天數較少的阿拉伯芥(組織培養條件下)試驗，另外，挑選 5 個 T<sub>2</sub> 轉殖品系(transgenetic lines 1, 2, 3, 5, 7)與野生株，播種於含有 Hygromycin B (20  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )、0.8% agar 的培養基中 6 天(野生株無抗生素篩選)，再轉移至直立式含 250  $\mu\text{M}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、1.2% agar 的培養基 3 天，接著移至含 250  $\mu\text{M}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$  的水耕培養(hydroponic culture)條件下 4 天，最後分別給予不同磷濃度(250, 50 or 10  $\mu\text{M}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )之養液 7 天(20-day-old)，平均每 2-3 天更換一次養液，試驗結束後，收取樣本植體進行表現型(phynotype)觀察拍照與 Pi 濃度測量。

### 無機磷濃度分析(Inorganic phosphate assay)

分析植體內無機磷的方法為參考前人研究(Ames, 1966; Chiou et al., 2006)。植物組織秤重後，每鮮重 1 mg 的組織加入 10  $\mu\text{L}$  的 1%冰醋酸(Glacial acetic acid, EMSURE, Darmstadt, Germany)，以高速組織均質機(2010 Geno/Grinder, SPEX SamplePrep, NJ, USA)將樣本震盪打碎，混合均勻後置於 42 °C 烘箱中培養 30 分鐘，之後，樣本在室溫下以高速離心機(Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland)10000 rpm 轉速離心十分鐘，取 10  $\mu\text{L}$  的上清液置於 96 孔盤，並加入 50  $\mu\text{L}$  的 1%冰醋酸及 140  $\mu\text{L}$  的磷萃取液(0.35%  $\text{NH}_4\text{MoO}_4$ 、0.86 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 、1.4% L-ascorbic acid) (Sigma)，以震盪混合器(Eppendorf Mixmate, Hamburg, Deutschland)充分混合後再置於 42 °C 烘箱中培養 30 分鐘；另外，以  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  配置含 0、5、10、25、50 nmole Pi 的標準品，樣本與標準品以盤式全波長光譜儀(Eon™ Microplate Spectrophotometer, BioTek, VT, USA)測定 820 nm 波長下的吸光值，最後以標準品繪製標準曲線，再計算樣本的 Pi 濃度與含量。

蝴蝶蘭葉片與根部的樣本為 3 棵植株的組織混合在一起，秤取鮮重約 1 g 的組織後研磨，因此每處理下的重複數為 1；阿拉伯芥地上部與地下部的樣本為每個培養皿中 10 棵植株混合在一起，每處理下共 3 個培養皿；水耕培養下的阿拉伯芥則

每處理下 5 重複，每重複 1 棵。



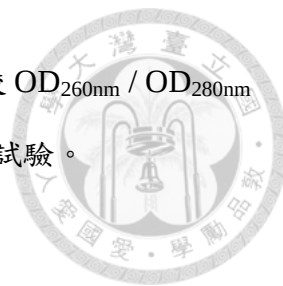
## 總核糖核酸萃取(Total RNA isolation)

### 1. 蝴蝶蘭

蝴蝶蘭 RNA 萃取方法為參考前人研究(Su et al., 2011; 2013b)，利用 CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide)方法萃取蝴蝶蘭葉片與根部 RNA。至-80 °C 低溫恆溫櫃中取出蝴蝶蘭葉片與根尖樣本並快速秤取 1 g 的組織(3 棵植物的組織混合在一起)，使用預冷的研鉢與杵於液態氮中將組織研磨至細緻粉末，以預冷藥杓將粉末括入 50 mL 全新離心管 (Labcon North America, CA, USA)中，加入 10 ml 預熱於 65 °C 的萃取緩衝液中，緩衝液含 2% (w/v) CTAB、2% 2-mercaptoethanol、20 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、100 mM Tris (pH 7.5)、2 M sodium chloride (NaCl) 及 1% (w/v) PVP 40 (polyvinylpyrrolidone 40)中，接著，快速震盪混合均勻後，置於 65 °C 中 15 分鐘，每 5 分鐘搖晃一次。

在室溫下以冷凍高速離心機 (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland)離心 3000 ×g 十分鐘，取上清液到另一個離心管中，加入等體積的 chloroform : isoamyl alcohol = 24:1 (v/v)，搖晃均勻後，室溫下離心 8000 ×g 十五分鐘，再重複上一個步驟，取上清液並加入等體積的 chloroform : isoamyl alcohol = 24:1 (v/v)，於室溫下離心 10 分鐘，接著，小心吸取上清液到新的離心管中，加入 0.33 倍體積的 8 M lithium chloride (LiCl)，將樣品置於 -20 °C 的冷凍庫中隔夜，進行 total RNA 的沉澱。

隔日於 4 °C 下離心 8000 ×g 30 分鐘，去除上清液，再加入預冷的 75% ethanol (Merk)，輕輕潤洗沉澱物，於 4 °C 下以 8000 ×g 離心 10 分鐘，倒掉乙醇，再以預冷的 100% ethanol (Merk)潤洗一次沉澱物，同樣於 4 °C 下離心 10 分鐘，最後，盡量去除所有液體，將離心管倒置於試管架上自然風乾約 30 分鐘，以適量的 RNase-free ddH<sub>2</sub>O 回溶 RNA，放置於-80 °C 下保存。使用超微量分光光度計 (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific INC., Wilmington, DE,



USA), 設定波長為 260 nm ( $OD_{260nm}$ ), 進行 RNA 濃度定量, 並比較  $OD_{260nm} / OD_{280nm}$  之比值, 當數值介於 1.8-2.0 之間, 表示樣本純度足以進行後續試驗。

## 2. 阿拉伯芥

將阿拉伯芥地上部(平均鮮重為 25 mg)於液態氮下快速震盪打碎後, 加入 1 mL RNAzol® RT (Molecular Research Center Inc., OH, USA) 並快速混合均勻, 再加入 400  $\mu$ L 高壓滅菌後的二次蒸餾水, 輕輕搖勻後在室溫下靜置 5-15 分鐘, 再以  $12000 \times g$  離心 15 分鐘, 吸取上清液, 加入 700  $\mu$ L isopropanol (Sigma), 輕輕搖勻後在室溫下靜置 15 分鐘, 接著以  $12000 \times g$  離心 10 分鐘, 小心倒掉上清液, 加入 400  $\mu$ L 75% ethanol (Merk) 潤洗沉澱物, 再以  $4000 \times g$  離心 3 分鐘, 重複洗滌 2 次, 最後加入 50  $\mu$ L diethylpyrocarbonate (DEPC) water, 萃取後的 total RNA 經定量及測量  $OD_{260nm} / OD_{280nm}$  之比值, 放置於  $-80^{\circ}\text{C}$  下保存。

## 基因組去氧核糖核酸萃取(Genomic DNA extraction)

### 蝴蝶蘭

於  $-80^{\circ}\text{C}$  低溫恆溫櫃中取出蝴蝶蘭少量的葉片與根尖樣本, 使用預冷的研鉢與杵於液態氮中將組織研磨至細緻粉末, 加入 400  $\mu$ L Extraction buffer (0.2 M Tris-HCl pH7.5, 0.25 M NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS), 混合均勻後, 以  $16000 \times g$  離心 1 分鐘, 吸取 300  $\mu$ L 的上清液, 加入 300  $\mu$ L isopropanol (Sigma), 再以  $16000 \times g$  離心 5 分鐘, 接著小心倒掉上清液後, 將離心管於  $37^{\circ}\text{C}$  下風乾 10 分鐘, 最後以  $1 \times$  TE buffer (1 mM Tris-HCl、0.1 mM EDTA) 回溶 DNA 沉澱物, 放置於  $-20^{\circ}\text{C}$  下保存。

## 基因表現分析(Gene expression analysis)

蝴蝶蘭與阿拉伯芥於 total RNA 萃取後操作步驟相同：

### 1. RNA 品質確認(RNA quality confirmation)

取 500 ng total RNA 與  $2 \times$  RNA loading dye (Fermentas, Thermo Fisher Scientific

INC., USA), 補二次蒸餾水至 10  $\mu$ L, 以稀釋 50 倍的 50x TAE buffer (2M Tris-base、1 M acetic acid、0.05 M EDTA) (Omics Biotechnology Co. LTD, Taiwan)、1%瓊脂膠體(Agarose Low EEO, Bio Basic Canada Inc., NY, USA)進行電泳分析, 並以 HealthView 核酸染劑 (Genomics, TPE, Taiwan) 染色膠體, 最後於 UV-box (ChemiDoc™, Bio-Rad Laboratories, CA. USA)下觀察 rRNA 26S 與 18S 的條帶。

## 2. DNA 水解酵素處理(DNase treatment)

取 10  $\mu$ g total RNA, 使用 TURBO DNA-free kit (Life Technologies Corporation, CA, USA), 加入 0.1 倍體積的 10 $\times$  TURBO DNase Buffer 及 1  $\mu$ L TURBO DNase, 混合均勻後, 置於 37  $^{\circ}$ C 水浴槽中 20-30 分鐘, 之後加入 0.1 倍體積的 DNase Inactive Buffer (使用前皆要震盪使 DNase Inactive Buffer 重新懸浮), 混合均勻後置於室溫中 2-5 分鐘, 於 4  $^{\circ}$ C 下離心 13000 rpm 五分鐘, 小心吸取上清液至新的離心管, 並再次定量 RNA 濃度, 並比較 OD<sub>260nm</sub> / OD<sub>280nm</sub> 之比值, 最後將放置於-80  $^{\circ}$ C 下保存。

## 3. 反轉錄聚合酶連鎖反應(Reverse-transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)

取 500 ng DNA-free RNA 於 0.2 mL 薄壁離心管中, 加入 1  $\mu$ L 40  $\mu$ M Oligo (dT) 引子、1  $\mu$ L 10 mM dNTP, 補二次蒸餾水至 12.5  $\mu$ L, 混合均勻後, 置於熱循環機 (DNA Engine Cycler, Bio-Rad Laboratories, CA. USA), 溫度設定為 65  $^{\circ}$ C, 反應 5 分鐘後, 立即移置到冰上並至少 1 分鐘, 之後加入 4  $\mu$ L 5 $\times$  FS buffer、2  $\mu$ L 0.1 M dithiothreitol (DTT)、1  $\mu$ L RNase out™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen, Life Technologies Co., CA, USA)、0.5  $\mu$ L M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Life Technologies Co., CA, USA), 輕輕混合均勻後, 反應總體積為 20  $\mu$ L, 接著於熱循環機以 37  $^{\circ}$ C 50 分鐘、70  $^{\circ}$ C 15 分鐘, 最後終止反應, 合成之 cDNA 產物放置於-20  $^{\circ}$ C 保存。



#### 4. 聚合酶連鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)

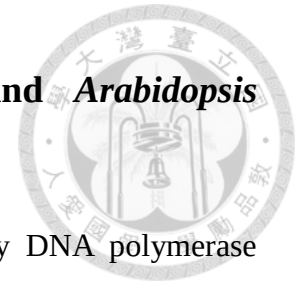
將 cDNA 原液以二次蒸餾水稀釋 20 倍，取 2  $\mu\text{L}$  20 $\times$  cDNA、0.5  $\mu\text{L}$  10 mM 正向引子、0.5  $\mu\text{L}$  10 mM 反向引子，加入 6  $\mu\text{L}$  2 $\times$  PCR Master Mix (0.05 U/ $\mu\text{L}$  *Taq* DNA polymerase, reaction buffer, 4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.4 mM of each dNTP) (Thermo Fisher Scientific INC., USA)，補二次蒸餾水至總體積 12  $\mu\text{L}$ ，混合均勻後，置於熱循環機中進行增幅反應，反應條件先為 94  $^{\circ}\text{C}$  2 分鐘，之後 94  $^{\circ}\text{C}$  30 秒、 $T_m$  (melting temperature)溫度 30 秒、94  $^{\circ}\text{C}$  30 秒至 1 分鐘(1 min/kb)，進行循環 25-35 個循環，最後 72  $^{\circ}\text{C}$  8 分鐘。反應產物以 50x TAE buffer、2%瓊脂膠體進行電泳分離，並以 HealthView 核酸染劑染色膠體，最後於 UV-box 下觀察拍照。引子設計為參考蘭花基因體資料庫 Orchidstra (<http://orchidstra.abrc.sinica.edu.tw/none/>) 網站中，蝴蝶蘭 *Phal. aphrodite* 之有編碼基因的 cDNA 序列進行設計。

#### 5. 影像分析(Image analysis)

為了比較不同試驗(Expt. 1-4)中，蝴蝶蘭於不同處理(+NPK、0.1P、0P)下 8、12 週的基因表現量，將 PCR 產物電泳分離後的膠圖影像，以 AlphaView 軟體 (ProteinSimple, CA, USA)分析每條條帶的影像像素(pixel)，藉以代表每條條帶的亮度，比較在同張影像下，各 cDNA 樣本的 PCR 產物擴增的多寡，同時也代表在 mRNA 層次的基因表現量之比較。軟體分析原理為在同張影像中，計算每個條帶在相同面積下校正後的像素值總和(Background corrected sum, BC Sum)。

在蝴蝶蘭基因表現驗證試驗中，先計算任一基因分別在各樣本的 BC Sum，接著除以肌動蛋白(Actin)的 BC Sum，將每個樣本做正規化(normalization)，最後，同一試驗同處理時間的樣本其數值再除以對照組(正常施肥處理+NPK)，以數值大小比較基因表現多寡，例如： $[(0.1P / \text{actin}) / (+NPK / \text{actin})]$  BCsum。

## 基因構築與阿拉伯芥轉殖 (Gene construct and *Arabidopsis* transformation)

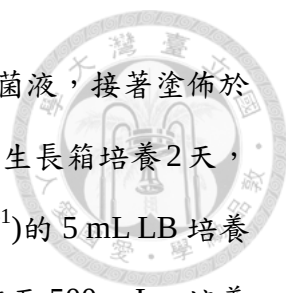


將基因 PATC128122 以 PCR 方式由 Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific INC., USA)擴增出 cDNA 全長片段，全長為 1083 bp，以瓊脂膠體電泳後確認片段大小後，回收產物並純化，再加入 2× PCR Master Mix kit (Thermo Fisher Scientific INC., USA)於 72 °C 下反應 10 分鐘，進行產物序列尾端加 A 步驟(addition of 3' A-overhangs post-amplification)，再次回收產物並純化，以 TA Cloning® Kit (Invitrogen, Life Technologies Co., CA, USA)方式，取 1 μL pCR® 8/GW/TOPO® vector、2 μL 產物片段、1 μL Salt solution，補水至總體積 6 μL，混合均勻後於室溫下反應 5 分鐘；接著進行大腸桿菌 *Escherichia coli* (*E. coli*)轉型作用(transformation)，取大腸桿菌勝任細胞 DH5α competent cell (Invitrogen, Life Technologies Co., CA, USA)置於冰上解凍，之後加入 2 μL 接合完成的質體，冰上靜置 5 分鐘後，將菌液以滅菌後的玻璃珠均勻塗在含抗生素 Spectinomycin (100 μg·mL<sup>-1</sup>) (Sigma)的 Luria-Bertani (LB)培養基，在 37 °C 下隔夜培養，接著挑選白色菌落並經 PCR 確認插入基因 PATC128122 之片段大小，再進行定序確認，接著挑出轉殖成功的 *E. coli*，以 LB 液體培養基在 37 °C 下隔夜震盪培養，最後以 Presto™ Mini Plasmid Kit (Geneaid Biotech Ltd., Taipei, Taiwan)抽取 *E. coli* 的質體。

接著以 Gateway® 技術(Invitrogen, Life Technologies Co., CA, USA)進行下一階段構築，取 1 μL pMDC32 vector (Curtis and Grossniklaus, 2003)與 2 μL pCR8/GW/TOPO/PATC128122 質體混合均勻，加入 0.5 μL LR Clonase™ II enzyme mix，在 25 °C 下隔夜培養，接著將產物進行如上述勝任細胞轉型作用，培養於含有抗生素 Kanamycin (100 μg·mL<sup>-1</sup>)的 LB 培養基，操作如上，確認菌落後，抽取成功轉殖之 pMDC32/PATC128122 質體。

接著進行農桿菌菌株勝任細胞的轉型作用，加入 10 μL 構築完成之載體，置於冰上 5 分鐘，再置於液態氮 5 分鐘，37 °C 水浴 5 分鐘後，加入 1 mL LB 培養基，





於 28 °C 下震盪培養 2-4 小時，離心後倒掉上清液至約 100  $\mu$ L 菌液，接著塗佈於含抗生素 Kanamycin (50 mg·mL<sup>-1</sup>) (Sigma) 的 LB 培養基，於 28 °C 生長箱培養 2 天，最後挑選成功轉殖之單一菌株，培養於含 Kanamycin (50 mg·mL<sup>-1</sup>) 的 5 mL LB 培養基，於 28 °C 下隔夜震盪培養，接著重複上述步驟，培養總體積至 500 mL，培養至菌液的 OD<sub>600</sub> = 1.6-2.0，以 4000  $\times g$  離心 20 分鐘，加入適量的 inoculation medium (1/2 MS salts, 1 $\times$  Gamborgs B5 Vitamins, 5% sucrose, 500 mg·L<sup>-1</sup> MES, 0.02% Silwet-77, 0.01 mg·L<sup>-1</sup> 6-benzylaminopurine) 使農桿菌重新懸浮於溶液中，調整菌液的 OD<sub>600</sub> = 0.8，接著將菌液滴在阿拉伯芥的花上後，將植物蓋上塑膠盒保持濕度，隔夜後置於生長箱中培養，直到成熟收取第一代 T<sub>1</sub> 種子。

註：感謝中央研究院邱子珍老師實驗室的李佳玲學姊幫忙進行構築與轉殖

## 西方墨點法分析(Western blot)

秤取阿拉伯芥根部組織鮮重後，於液態氮下震盪磨碎，每 1 mg 的組織加入 3  $\mu$ L total protein extraction buffer (60 mM Tris-HCl pH8.5, 2.5% glycerol, 0.2 mM EDTA, 2% SDS)，及 1 $\times$  Protease inhibitor cocktail (Roche, Basel, Switzerland) 及 1 mM Phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF) (Sigma)，混合均勻後置於 70 °C 下 10 分鐘，以 16000  $\times g$  離心 10 分鐘，小心吸取上清液至新管。接著，以 Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) 進行蛋白質樣本定量，取 2  $\mu$ L 蛋白質樣本、8  $\mu$ L total protein extraction buffer，加入 50  $\mu$ L reagent A'，混合均勻後靜置於室溫下 5 分鐘，接著加入 400  $\mu$ L reagent B，混合均勻後靜置於室溫下 5 分鐘，另外，配置 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, or 0 mg/mL bovine serum albumin (BSA) (Bio Basic Canada Inc., NY, USA) 的標準品，取 200  $\mu$ L reaction solution 和 BSA 標準品至 96 孔盤，以盤式全波長光譜儀測定 750 nm 波長下的吸光值，最後以標準品繪製標準曲線，定量蛋白質樣本。

取 50  $\mu$ g 蛋白質樣本，加入 5  $\mu$ L NuPAGE<sup>®</sup> 4 $\times$  sample buffer (Invitrogen, Life Technologies Co., CA, USA)、2  $\mu$ L 0.5 M DTT，補水至總體積 20  $\mu$ L，混合均勻後



置於 70 °C 下 10 分鐘，接著於電泳槽中加入稀釋後 1× NuPAGE® running buffer，樣本於 NuPAGE® Bis-Tris Mini Gel 上以 100 伏特 2 小時進行電泳分離，隔天取出膠體後，將膠體隔著蛋白質轉漬濾膜(polyvinylidene difluoride membrane)，夾在濾紙、海綿中間，在電泳內槽中加入 1× NuPAGE® transfer buffer，外槽中加入水，以 30 伏特進行轉漬 90 分鐘。取出轉漬濾膜後，將其放入 Ponceau S solution (MDBio, Inc., Taipei, Taiwan)液體中染色，另外，以 1× PBST buffer (1× PBS buffer 與 0.2% Tween 20 配製而成，pH 7.2)加入 1% BSA 配置阻斷液(blocking reagent)，將轉漬濾膜放進 blocking reagent 中，在搖擺式震盪器上以 25 rpm 的速率搖晃 1 小時，接著以 1× PBST buffer 潤洗轉漬濾膜，再換至以 1× PBST buffer 配置的一級抗體(PHO1, PHT1;1/2/3, PHT1;4 antibody) (Liu et al., 2011; Liu et al., 2012)中搖晃 2 小時，以 1× PBST buffer 潤洗轉漬濾膜後，換至以 blocking reagent 配置的二級抗體(稀釋 20000 倍的 Goat Anti-Rabbit horseradish peroxidase, GAR-HRP)中搖晃 2 小時，再以 1× PBST buffer 潤洗轉漬濾膜，拍照觀察前，將轉漬濾膜浸至 WesternBright™ ECL-spray (Advansta Inc., CA, USA)，移至高解析度冷光影像分析系統 (FluorChem™ HD2 System, ProteinSimple, CA, USA)下進行冷光偵測觀察。最後，將轉漬濾膜以 Naphthol blue black staining solution (0.1% naphthol blue black、10% methanol、2% acetic acid)染色，風乾後掃描存檔，作為 loading control。

### 核糖核酸原位雜交(RNA in situ hybridization, RNA-ISH)

此試驗除了探針構築，組織的石蠟切片、探針製備及雜交皆委託中央研究院南部生物技術中心辜瑞雪老師實驗室協助，並參考前人研究(Lin et al., 2014)。目標 ISH 偵測基因為 PATC128122、PATC144588，分別根據 Orchidstra 資料庫設計分別 214 bp 與 277 bp 長度的特定序列，並經過 Blastn 與資料庫進行序列比對，核苷酸 GC 比例分別為 50%與 41%，構築到 pGEM-T 載體(Promega, Madison, USA)，定序確認後，以 SP6/T7 digoxigenin (DIG) RNA labeling kit (Roche, USA)製備探針，分別以 SP6 polymerase 或 T7 polymerase 合成反股(antisense)或正股(sense)探針。RNA



樣本部分，取蝴蝶蘭由上往下數第一片成熟葉的中肋及自根尖往上測量 0.5 cm、3 cm 處的根部組織，以 4% paraformaldehyde、4% dimethylsulfoxide、0.25% glutaraldehyde、0.1% Tween 20 及 0.1% Triton X-100 於 4 °C 下隔夜進行組織樣本固定。試驗全程以 DEPC-H<sub>2</sub>O (diethylpyrocarbonate-treated H<sub>2</sub>O) 操作或配置 PBS。固定樣本後以組織包埋機 KOS Rapid Microwave Labstatin (Milestone, USA) 進行系列脫水及滲蠟(Paraplast, Leica, USA)。並以切片機 MICRON 315R microtome (Thermo, Scientific, USA) 將組織切成厚度 10 μm 的切片，固定在 poly-L-lysine-coated 玻片 (Matsunami, Japan) 上。之後，樣本切片於對二甲苯(xylene)溶液中脫蠟，接著逐漸減少酒精(ethanol)進行復水，在 37 °C 下 30 分鐘以 2 mg·mL<sup>-1</sup> proteinase K 使蛋白質降節。而樣本與探針的原位雜交(ISH)操作參考前人研究(Bi et al., 2005)。以 NBT/BCIP detection kit (Roche, USA) 進行雜交後訊號的偵測。最後以 Zeiss Axio Scope A1 microscope 顯微鏡與 AxioCam HRC camera 相機(Zeiss, Oberkochen, Germany) 進行觀察拍照。

## 生物統計分析

本試驗中，為了比較阿拉伯芥 35S::PATC128122 轉植株與野生株有無顯著差異，將各品系與野生株的鮮重、無機磷濃度和含量等資料以 COSTAT 6.2 (CoHort Software, CA, USA) 統計軟體，進行變方分析(ANOVA)及最小顯著差異分析(Least significant difference, LSD)，分析各處理間  $P \leq 0.05$  有無顯著性差異。

## 結果

### 一、蝴蝶蘭於缺磷下的基因表現驗證

本試驗自游(2012)以 cDNA 微矩陣方法偵測蝴蝶蘭 *Phal. Sogo Yukidian* ‘V3’ 於缺氮(0.1N 和 0N)、缺磷(0.1P 和 0P)、缺鉀(0.1K 和 0K)下的基因表現變化結果中，挑出蝴蝶蘭受缺磷影響而反應的候選基因清單，分別以表現倍率 fold change  $\geq 3$  (上調表現) 或 fold change  $\leq -3$  (下調表現) 的標準篩選，挑選在葉片中大量上調表現的

15 個基因或下調表現的 4 個基因(表 5.1),和在根部中大量上調表現的 16 個基因或下調表現的 5 個候選基因(表 5.2),扣掉在葉片與根部重複的候選基因 PATC128122、PATC154300、PATC089322,共有 37 個候選基因,其中有 20 個基因於 NCBI 網站上以 Blastx 分析結果為 unknown protein (表 5.1、5.2)。接著,根據蘭花基因體資料庫 Orchidstra (<http://orchidstra.abrc.sinica.edu.tw/none/>) 網站內蝴蝶蘭 *Phal. aphrodite* 之有編碼基因的 cDNA 序列進行引子設計(表 5.3),以 RT-PCR 方法驗證微矩陣結果。

在本試驗中,使用的蝴蝶蘭樣本為第二章試驗中相同材料,蝴蝶蘭 *Phal. Sogo Yukidian* 'V3'分別於 3 種不同濃度 1.61 mM (+NPK)、0.16 mM (0.1P)、0 mM (0P) 的磷肥處理下 8 週、12 週後,外觀及生理調查完後,剪取由上往下數第一片葉及根尖往上 5 cm 內的根部組織進行取樣,此試驗共重複四次,因此抽取四批樣本的 RNA 進行基因表現分析,但本論文中只呈現其中兩個重複試驗的驗證結果(experiment 1 & 2)。首先,蝴蝶蘭於兩次重複試驗中,比較葉片與根部組織內的無機磷濃度,缺磷處理 8 週及 12 週的無機磷皆明顯少於對照組(圖 5.1),除了 experiment 2 中 0.1P 處理 12 週的根部,其無機磷濃度高於對照組(圖 5.1B)。確認缺磷處理的組織內無機磷濃度下降後,萃取蝴蝶蘭樣本的 total RNA 並檢測品質,可清楚看到核糖體 RNA (ribosomal RNA)之 28S 與 18S 的條帶(圖 5.2),接著樣本反轉錄成 cDNA 後,以肌動蛋白基因(actin, PATC157348)中跨越內含子(intron)的引子(PaActin-GF & PaActin-GR)進行擴增,以蝴蝶蘭 genomic DNA 作對照組,cDNA 樣本經 RCR 後與 genomic DNA 片段大小不同,確認 cDNA 樣本中無 genomic DNA 汙染(圖 5.3)。

最後,以 RT-PCR 方式分析所有樣本(共 24 個)在不同處理及不同時間下的基因表現,從葉片挑選出來的 19 個候選基因中,有 15 個候選基因可以進行條帶亮度影像分析(圖 5.4),從根部挑選出來的 21 個候選基因中,有 15 個候選基因可以進行條帶亮度影像分析(圖 5.5),在同一個候選基因結果中,將各樣本的條帶像素

(pixels)值，除以相同樣本的 actin 表現作 normalization，再將各處理 normalized 後的值除以+NPK，比較 PCR 條帶亮度差異倍數。最後所有結果整理在表 5.4。

結果主要分為五大組，第一組為微矩陣中葉片與根部皆上調表現的候選基因 PATC128122 與 PATC154300，兩者葉片的 fold change 在 0.1P 和 0P 處理下皆高，以 RT-PCR 驗證結果顯示，缺磷 12 週後，葉片中 Expt. 1 和 2 的 0P 處理下條帶亮度差異倍數亦高(表 5.4)。PATC128122 在微矩陣結果中其 fold change 分別在葉片與根為 31.3 倍和 6.1 倍，是葉片中 fold change 最高的候選基因，以 RT-PCR 驗證結果顯示，在缺磷 12 週後於 0P 處理下明顯偵測到其大幅增加表現量，條帶亮度差異倍數在葉片與根部分別高達 9.0 倍與 9.7 倍，且在葉片與根部皆可偵測到，+NPK 與 0.1P 處理則幾乎看不到條帶(圖 5.4、圖 5.5)，因此，PATC128122 為所有候選基因中，受缺磷調控表現量差異最大且顯著的基因，蛋白質上具有一 C3HC4-type RING finger domain 的功能區域(圖 5.7A)。根據 NCBI 網站上 blastx 的結果，PATC154300 其蛋白質上具有一 glycosyltransferase GTB type superfamily 的功能區域，在驗證結果中，缺磷 8 至 12 週後，隨著磷濃度降低，葉片與根部中表現量增加，以葉片中表現量較根部高，而 Expt. 2 中表現較 Expt. 1 弱，顯示蝴蝶蘭植株同一批試驗下，不同重複試驗的樣本表現量有不一致情形(圖 5.4、5.5)。

第二組為微矩陣中葉片內缺磷上調表現的候選基因，在葉片中 fold change 高，以 RT-PCR 驗證結果顯示，隨著磷濃度降低，大部分的基因如 PATC155606、PATC126861、PATC129837、PATC156594、PATC141818、PATC089322、PATC139852、PATC138298 在葉片中的表現量皆增加(圖 5.4)，Expt. 2 在缺磷 0P 處理 12 週後，差異倍率皆最大，影像分析倍率達 3.0-7.4 倍(表 5.4)，而根部內表現量則與對照組沒有差異(表 5.4、圖 5.4)，顯示以上候選基因受缺磷調控之上調表現主要反應在葉片內。其中，PATC089322 在兩次重複試驗樣本中，無論於缺磷 8 週或 12 週後，皆於 0P 處理下表現量明顯提高，而在微矩陣的根部結果中，雖然 PATC089322 於 0.1P 下 fold change 為 6 倍，但在 RT-PCR 結果看不到根部內 PATC089322 條帶(表

5.4、圖 5.4)。另外，PATC144588 在微矩陣結果中 fold change 大於 3 倍，但本次 RT-PCR 分析結果中表現量與對照組無差異(表 5.4、圖 5.4)；PATC151267 在微矩陣結果中 fold change 於 0.1P 處理中高達 12.7 倍，0P 處理僅 3.5 倍，然而本次 RT-PCR 驗證結果為，在缺磷處理下其表現量明顯下降，表現倍率於 Expt. 1 中 0.1P 和 0P 處理下低於 0.5 倍(表 5.4、圖 5.4)，與微矩陣數據不符。

第三組為微矩陣中葉片內缺磷下調表現的候選基因，在葉片中 fold change 倍率於 0.1P 或 0P 處理下皆非常低，其中 3 個基因分別為 PATC153190、PATC154014、PATC063029，RT-PCR 分析結果後表現量與對照組沒有差異(表 5.4、圖 5.4)，PATC063029 在樣本中可能原始表現量已經很低，PCR 擴增至 35 循環其表現量仍很弱(圖 5.4)。在本試驗中，微矩陣資料中葉片內顯著下調表現的候選基因，以新的一批樣本與 RT-PCR 方式分析，表現量於缺磷處理下皆不如微矩陣資料中呈現顯著地下降。

第四組為微矩陣中根部缺磷上調表現的候選基因，大部分候選基因在 0.1P、0P 處理下 fold change 不一致，其中 fold change 皆高於 3 倍的候選基因有 PATC145532、PATC045332、PATC045659、PATC219670、PATC159699，在 RT-PCR 分析下，PATC045332、PATC045659、PATC159699 在 Expt. 1 中 0.1P 和 0P 處理下根部內表現倍率大於 2 (表 5.4)，但此三個候選基因可能在樣本中原始量低，PCR 擴增至 35 循環其表現量仍很弱(圖 5.5)；PATC145532 與 PATC159699 在 RT-PCR 分析下，表現量與對照組無差異(表 5.4、圖 5.5)。而有些候選基因，fold change 在 0.1P 或 0P 處理下不一致，例如 PATC139613 與 PATC139613 僅在 0P 處理下 fold change 高於 3 倍，其 RT-PCR 分析表現量與對照組相近(表 5.4)；根部在 0.1P 處理下 fold change 以 PATC071900 最高，fold change 為 21.2 倍，但 RT-PCR 分析結果僅於 Expt. 2 樣本表現略微增加(表 5.4、圖 5.5)。綜合上述，RT-PCR 之分析並無法驗證微矩陣資料中根部大部分候選基因上調表現的現象。

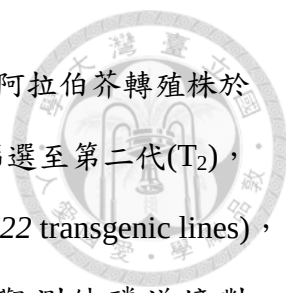
第五組為微矩陣中根部缺磷下調表現的候選基因，在根部中 fold change 倍率於 0.1P 或 0P 處理下皆非常低，其中 PATC105076 在 0.1P 與 0P 處理下 fold change 為-17.3 與-10.6 倍，但在 RT-PCR 分析下，表現量與對照組無差異(表 5.4、圖 5.5)；另外 PATC231430、PATC225601、PATC073314 可能在樣本中原始量低，PCR 擴增至 35 循環其表現量皆很弱(圖 5.5)。因此本試驗中，無法驗證出蝴蝶蘭在缺磷下根部顯著地下調表現的候選基因。

上述基因經 RT-PCR 擴增產物後，有一些基因晶電泳分離後具有雙條帶(double band)現象，如 PATC128122、PATC141818、PATC159699、PATC073314(圖 5.4、5.5)。另外，在所有 37 個候選基因中，有 10 個基因以梯度 PCR 測試 Tm 溫度介於 48-60 °C 之表現，但大多數基因之 PCR 產物於電泳跑膠後無法偵測到明顯條帶，或 PCR 產物片段大小與預期不符，如 PATC146454、PATC072900 (表 5.5)。

## 二、缺磷逆境對阿拉伯芥 35S::PATC128122 轉植株之影響

自微矩陣結果(游，2012)中，挑選出在缺磷處理下顯著反應的候選基因 PATC128122，在葉片內其 fold change 於 0.1P 與 0P 處理下分別為 25.2 倍與 31.2 倍(表 5.1)，在根部內其 fold change 於 0.1P 與 0P 處理下分別為 6.9 倍與 8.0 倍(表 5.2)，並不受缺氮、缺鉀處理而誘導表現。因此，本試驗以新的一批樣本與 RT-PCR 方式分析，跑膠結果顯示，對照組樣本中無明顯條帶，葉片與根部在 0P 處理下 12 週後，皆會大幅增加其表現量(圖 5.4)，且主要受缺磷處理(-P)而大量誘導反應，氮、磷、鉀同時缺乏(-NPK)處理下，則略增加表現量，但不受缺氮(-N)、缺鉀(-K)影響(圖 5.6)，因此可以確認 PATC128122 為蝴蝶蘭受缺磷逆境調控下顯著反應的基因，且其反應對缺磷具專一性。

為了進一步探討 PATC128122 之功能，以 PATC128122 5' -344 及 PATC128122 3' +713 之引子，擴增 cDNA 全長共 1083 bp(圖 5.7A)，最終構築至具兩倍花椰菜嵌紋病毒(Cauliflower mosaic virus, CaMV)35S 啟動子之表現載體 pMDC32(圖 5.8)，並



轉殖至哥倫比亞型的阿拉伯芥，以探討大量表現 PATC128122 對阿拉伯芥轉植株於不同磷濃度生長下的影響。轉植株經過抗生素 Hygromycin B 篩選至第二代(T<sub>2</sub>)，最終挑選 9 個過量表現 PATC128122 之轉殖品系(35S::PATC128122 transgenic lines)，種植於不同磷肥之條件下，如 250、50 或 10  $\mu$ M Pi，觀測缺磷逆境對 35S::PATC128122 轉植株的影響。本試驗中，11 天大的阿拉伯芥，經過 6 天不同磷濃度培養基處理後，抽取地上部植體 RNA，經 RT-PCR 分析確認於 35S::PATC128122 轉植株 9 個品系內皆有表現 PATC128122(圖 5.9)，接著，比較 35S::PATC128122 轉植株與野生株之間的植體鮮重、無機磷濃度與含量，結果顯示，無論於充足供磷或缺磷條件下，將 35S::PATC128122 各品系與野生株作比較，大部分轉植株的鮮重、無機磷濃度、無機磷含量皆與野生株皆沒有差異(表 5.6-5.8)，僅在 50  $\mu$ M Pi 處理下，有 50%以上的轉殖品系(line 1, 3, 5, 10, 16)的地下部鮮重與地下部 Pi 含量低於野生株(表 5.6、5.8)。另外，以西方墨點轉漬法分析磷轉運蛋白 PHO1、PHT1;4 與 PHT1;1/2/3 在轉植株地下部的表現，結果顯示，無論於充足供磷或缺磷條件下，9 個轉殖品系之間的 PHO1、PHT1;4 與 PHT1;1/2/3 蛋白質表現量皆不一致(圖 5.10)，與野生株比較下並無一致的差異；外觀上，栽培於缺磷 10  $\mu$ M Pi 條件下之植株，其地上部較小、地下部具較多根毛，但轉植株與野生株在不同濃度磷條件相較下外觀無差異(圖 5.11)。

挑選 5 個阿拉伯芥 35S::PATC128122 轉植株品系與野生株栽培於水耕環境下，觀察缺磷逆境對成熟(20 天大)的轉植株之影響。結果如上述，無論於充足供磷或缺磷條件下，將 35S::PATC128122 各品系與野生株作比較，大部分轉植株的鮮重、無機磷濃度、無機磷含量與野生株皆沒有差異(表 5.9)；外觀上，轉植株與野生株在不同濃度磷條件相較下亦無差異(圖 5.12)。

以 RT-PCR 分析 PATC128122 於蝴蝶蘭及阿拉伯芥在 mRNA 層次上的表現，使用的引子為擴增 cDNA 全長 1083 bp 的 PATC128122 5' -344 及 PATC128122 3' +713，電泳分離後結果顯示，除了位於約 1 kb 位置之主要產物外(為 PATC128122





cDNA 全長)，在缺磷的蝴蝶蘭 *Phal. Sogo Yukidian* ‘V3’ 樣本中，位於約 400 bp 位置上有第二條條帶，懷疑可能為 PATC128122 於蝴蝶蘭內的一選擇性剪切形式(P1)；而在阿拉伯芥 35S::PATC128122 轉植株樣本中，位於約 700 bp 位置上下有第二、第三條條帶，全長較長之片段(A1)與較短之片段(A2)，因在野生株之樣品中並無偵測到這些條帶，因此懷疑可能是在阿拉伯芥轉植株內特殊的選擇性剪切形式，A1 形式的片段表現量高於主要產物，A2 形式的片段表現量較弱，P1 更弱(圖 5.13A)。將 A1、A2、P1 之片段經切膠純化後，進行定序確認，定序結果顯示，在 A1、A2、P1 之片段 5' 的剪切位置是相同的，但 3' 的剪切位置則不相同(圖 5.13B、C)，因此片段大小不一樣。接著，搜尋主要產物與選擇性剪切後的片段上的預期編碼區(coding sequence, CDS)，根據 Orchidstra 基因資料庫顯示，PATC128122 之 cDNA 全長為 1083 bp，預測其最大編碼區全長為 570 bp，編碼 190 個胺基酸，在全長序列 567-772 bp 位置具有一 C4HC3 zinc-finger 形式的 RING-variant domain (圖 5.13B)；而 A1、A2 片段全長分別為 721 bp、658 bp，兩片段上仍可預期具有一個相同、長度 408 bp 的編碼區(coding sequence, CDS)，編碼 136 個胺基酸，其胺基酸序列與原全長一致，仍保留 RING-variant domain (圖 5.13B)；P1 片段則可能不具編碼區，不會進行轉譯蛋白質。

### 三、原位雜交偵測 PATC128122、PATC144588 於蝴蝶蘭組織之表現位置

PATC128122 為蝴蝶蘭受缺磷調控下顯著反應的基因，可轉譯一具 C3HC4-type RING finger domain 的蛋白質；PATC144588 之 cDNA 全長為 2430 bp，預測其最大編碼區全長為 1602 bp，編碼 534 個胺基酸，在全長序列 516-2024 bp 位置具有一 Major Facilitator Superfamily (MFS) domain (圖 5.7B)，根據 NCBI 網站上 blastx 的結果，PATC144588 可能為一種無機磷轉運蛋白(inorganic phosphate transporter)。為了更進一步瞭解 PATC128122 與 PATC144588 於蝴蝶蘭組織內的表現情形以及推測其可能的功能，因此以 RNA 原位雜交方式分別偵測此兩類 mRNA 表現之位置，設計約 200-250 bp 之探針(圖 5.7)，分別偵測蝴蝶蘭正常施肥或缺磷 23 週後的葉片



與根部。

結果顯示，無論於正常施肥(+NPK)或缺磷(-P)處理下，在蝴蝶蘭根部離跟尖 0.5 cm、3 cm 之位置，皆可在皮層組織、中柱的韌皮部上觀察到 PATC128122 之表現，尤其以皮層上薄壁細胞表現較明顯(圖 5.14)，葉片中則主要表現在中肋之維管束上(圖 5.15)，葉肉細胞也有表現但較不明顯。PATC144588 結果與上述相似，無論缺磷與否，主要表現在根部的皮層組織、中柱的韌皮部上(圖 5.16)及葉片中肋的維管束上(圖 5.17)。在同一組的五次重複中(樣本共 5 個重複)，每次雜交呈色情形不一致，因此無法以顏色多寡判斷基因表現量。而在本試驗中，缺磷的蝴蝶蘭葉片中肋內，維管束的韌皮部數量皆多於正常施肥處理的樣本(圖 5.15、5.17)，通常葉片中維管束下方為韌皮部之位置，但在維管束左右兩側，也觀察到具有韌皮部。

## 討論

### 一、以 RT-PCR 方式驗證微矩陣基因表現之結果比較

游(2012)以 cDNA 微矩陣方法(cDNA microarray)偵測蝴蝶蘭 *Phal. Sogo Yukidian* 'V3'於缺氮、磷、鉀下的基因表現變化，肥料分別在缺氮處理下給予 0.71 mM (0.1N)或 0 mM (0N)的  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ，缺磷處理下給予 0.16 mM (0.1P)或 0 mM (0N)的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ，缺鉀處理下給予 0.38 mM (0.1K)或 0 mM (0K)的 KCl，並於處理 8 週後以微矩陣方法進行分析蝴蝶蘭葉片與根部的基因表現變化，使用之晶片為 Orchidstra 資料庫所設計之第二版蝴蝶蘭微矩陣晶片(Su et al., 2013a, b)。本試驗之目的為驗證及挑選蝴蝶蘭於缺磷逆境下反應之基因，因此挑選蝴蝶蘭於缺磷下的微矩陣資料中 37 個候選基因，分別在葉片或根部中大量上調或下調表現，其改變倍數(fold change)皆大於 3 倍(表 5.1、5.2)。

利用微矩陣偵測生物體內基因表現的技術目前已非常普遍，可全面且快速地獲得大量資訊，但過程中需經過嚴謹地執行、分析與驗證，第一步通常為微矩陣



品質的確認，透過微矩陣上對照組的設置、相同或不同 RNA 樣本下的微矩陣重複次數等，接著經過分析篩選後，透過統計或文獻比對的分析，挑選候選或關鍵基因，利用定量反轉錄(Quantitative reverse transcription PCR, qRT-PCR)並以新樣本驗證之，以確認微矩陣資料的正確性(Chuaqui et al., 2002; Leung and Cavalieri, 2003)。

本試驗重複游(2012)之試驗，準備新的樣本，並根據 Orchidstra 資料庫提供之 cDNA 序列設計引子，以 RT-PCR 方式驗證其微矩陣資料中數個 mRNA 的基因表現，期望以新的樣本，驗證之前微矩陣資料之結果，尋找到蝴蝶蘭面臨缺磷逆境時，確實會改變表現的基因。

蝴蝶蘭對於養分逆境反應緩慢(Hew and Yong, 2004)，蝴蝶蘭缺磷(0.1P 或 0P)8 週後，葉片的磷(total P)濃度相較於對照組減少 71%，根部的磷濃度相較於對照組減少 58%-74%(游, 2012)；本試驗中，以 Expt. 2 之植株在缺磷 12 週後的無機磷(Pi)濃度下降最顯著，葉片與根部的 Pi 濃度相較於對照組平均分別下降 42%及 25%(圖 5.1)。確認 0.1P 及 0P 樣本中 Pi 濃度低於+NPK 對照組後，以 RT-PCR 分析葉片與根部缺磷 8、12 週後的基因表現，結果顯示，大部分葉片中上調表現的 15 個候選基因在 RT-PCR 分析結果內，10 個候選基因隨著缺磷時間增加(12 週)、磷肥濃度降低(0P)，基因表現量提高(表 5.4、圖 5.4)，以 Expt. 2 之植株在缺磷 12 週後增加表現量之情形最明顯；2 個候選基因(PATC144588、PATC151267)之 RT-PCR 結果與微矩陣之 fold change 不符，表現量與對照組沒有差異、或下調表現(表 5.4、圖 5.4)；而 3 個候選基因在 RT-PCR 結果觀測不到條帶或擴增之片段長度與預期不符(PATC146454)(表 5.5)，因此無法驗證。

另外，葉片中下調表現的候選基因、根部中上調表現的候選基因、根部中下調表現的候選基因其 fold change 倍率皆非常高，倍率多為微矩陣資料中各組的前三名之高，如 PATC063029、PATC145532、PATC105076，但此三組於 RT-PCR 結果中，皆與對照組表現量差異不大，或表現量很低(表 5.4、圖 5.4、5.5)，候選基因無法被驗證。因此，四組候選基因分類中，僅有葉片中上調表現的候選基因能被

驗證且與微矩陣結果相符，可確定為蝴蝶蘭面臨缺磷逆境時，葉片中誘導反應之基因。



此試驗中，大部分候選基因表現量不如預期，目前，推論可能的原因有：1. 微矩陣資料分析過程中條件設定問題，如 normalization 條件太寬，使得過多不可信的雜訊一起呈現。2. 候選基因在蝴蝶蘭樣本中本身 mRNA 表現量很低，因此造成微矩陣或 RT-PCR 的技術在偵測上有誤差較大的問題。3. 微矩陣與本試驗使用的兩批蝴蝶蘭樣本之間的差異或處理、生長環境上的差異。至於有些基因因偵測不到或擴增之片段長度與預期不符而無法進行驗證的情形(表 5.5)，推論的原因有：1. 因為候選基因之連續體(contig)長度較短，因此設計的引子之反應條件不佳，如 PATC181362 RT-R 序列有連續的 A。2. 資料庫提供之 cDNA 序列組裝不完整或不正確，造成有些 PCR 反應產物與預期片段不符，或無法擴增產物。

另外，本試驗與游(2012)之試驗的差異，除了蝴蝶蘭試驗場所分別於臺灣大學或中央研究院的人工氣候室，操作上唯一不同的地方為，游(2012)試驗中於施肥處理前，蝴蝶蘭植株經過一個月的恢復期(僅以一次水澆灌)，本試驗除了給予一個月的恢復期，再給予一個月的正常施肥期，澆灌兩次各 100 mL 的+NPK 肥料，接著再開始進行缺乏不同養分之肥料處理。因此本試驗中，RT-PCR 分析結果，以葉片中上調表現的候選基因在缺磷 12 週之表現量增加較顯著(表 5.4、圖 5.4)。

## 二、蝴蝶蘭於缺磷下大量誘導表現之基因 PATC128122

PATC128122 為所有候選基因中，與對照組表現量差異最大之基因，葉片與根內皆可偵測到，且僅在 0P 處理下大量誘導表現(圖 5.4)；在微矩陣資料中，在葉片上調表現基因中 fold change 最高，高達 31.3 倍(游，2012)，當植株缺磷長達 32 週後(經低溫誘導催花)，PATC128122 於葉片中其 fold change 甚至高達 1676 倍(資料未顯示)。另外，在缺氮、缺磷、缺鉀、-NPK (同時缺氮磷鉀)之樣本中，PATC128122 僅大量表現於缺磷處理中，少量表現於-NPK 處理中(圖 5.6)，顯示 PATC128122 對

於缺磷反應之獨特性。但以 Orchidstra 提供之 cDNA 序列與 NCBI 網站進行 Blastx 分析，大部分顯示為未知的(unknown)蛋白質，但在 cDNA 全長序列 567-772 bp 位置具有一 C4HC3 zinc-finger 形式的 RING-variant domain (圖 5.13B)，屬於 RING superfamily；另外於 TAIR 網站進行 Blastx 分析，最相似的 homolog 為 AT5G05830 (E-value = 4.00E-32)，目前沒有詳細的功能研究，但可能與 ubiquitin protein ligases 有關，參與蛋白質的降解(Dieterle et al., 2005)。

### 三、大量表現 PATC128122 於阿拉伯芥

為了進一步研究 PATC128122 之功能，因此將 PATC128122 構築於含有兩倍 35S 啟動子之表現載體 pMDC32 (圖 5.8)，並大量表現於阿拉伯芥中，以觀察其造成的改變。分別試驗不同成熟度的野生株與 35S::PATC128122 轉植株於組織培養或水耕系統下，給予不同濃度 250、50、10 mM Pi 之處理，雖然以 RT-PCR 分析 11 天大的植株地上部之 PATC128122 表現，可確認此基因確實有表現 mRNA 於 35S::PATC128122 轉植株 9 個品系中(圖 5.9)，但無論於充足供磷或缺磷條件下，轉植株的鮮重、Pi 濃度、Pi 含量及外觀皆與對照組相似(表 5.6-5.9、圖 5.11、5.12)，且膜蛋白 PHO1 與磷轉運蛋白 PHT1;1/2/3、PHT1;4 之蛋白質表現量也與對照組沒有顯著差異(圖 5.10)，顯示 PATC128122 雖有表現於轉植株中，但是並沒有造成與對照組具顯著差異的表現型(phenotype)，或改變轉植株於缺磷逆境下的生長反應，目前推論無法在 35S::PATC128122 轉植株看出差異的原因有：1. 在蝴蝶蘭中，PATC128122 可能需要與其他因子一起進行作用，單獨轉殖 PATC128122 至阿拉伯芥體內，可能無法發揮其作用。2. 在蝴蝶蘭中，PATC128122 可能於特定的時間或在特定的細胞或組織進行作用，以 35S 啟動子普遍地表達 PATC128122 於阿拉伯芥體內可能無法發揮其作用。3. 在阿拉伯芥轉植株中，目前僅確認 mRNA 之表現，但無 PATC128122 之抗體可偵測後續的蛋白質有無表現。4. PATC128122 的功能可能在後轉譯層次上受到影響，而在阿拉伯芥轉植株中無法被正確調控。5. 於本試驗中發現轉植株地上部的 mRNA 表現上，具有選擇性剪切(alternative splicing)之現

象，除了主要產物(1083 bp)，還具有兩條明顯的小片段 mRNA (圖 5.9、5.13A)，長度分別約 721 bp 與 658 bp(圖 5.13B)，而此現象對於後續 PATC128122 之表現造成的影響不清楚，以上原因皆可能導致將基因轉殖至阿拉伯芥中的方法無效，無法幫助我們進一步探究功能。

#### 四、以原位雜交偵測蝴蝶蘭基因表現位置

在微矩陣資料中，蝴蝶蘭葉片於缺磷下 PATC144588 其 fold change 為 3.5 (游，2012)；然而，在本試驗中以 RT-PCR 分析，PATC144588 於缺磷下表現量與對照組沒有差異(圖 5.4)。根據 Orchidstra 資料庫顯示，PATC144588 可能為一種磷轉運蛋白，以 cDNA 序列與 NCBI 網站進行 Blastx 分析，在 cDNA 全長序列 516-2024 bp 位置具有 MFS domain，Blastx 分析結果與許多物種如海棗 *Phoenix dactylifera*、芭蕉 *Musa acuminata* 之磷轉運蛋白 PHT1;4 或 PHT1;8 胺基酸序列相似。另外於 TAIR 網站進行 Blastx 分析，最相似的 homolog 為 AT2G38940，為磷轉運蛋白 PHT1;4，屬於 PHT1 家族，PHT1 為阿拉伯芥缺磷下誘導反應的磷轉運蛋白(Nussaume et al., 2011)，其中 PHT1;4 與 PHT1;1 為 PHT1 家族中表現量較高，且在充足磷肥下，也扮演轉運無機磷的功能，為重要的磷轉運蛋白(Shin et al., 2004)。

因此 RNA-ISH 試驗中，選擇蝴蝶蘭缺磷下高反應的基因 PATC128122 與磷轉運蛋白 PATC144588 為偵測對象，期望進一步地瞭解兩基因在葉片與根部組織內的表現位置。結果顯示，根部的 0.5 cm 或 3 cm 位置，皆可偵測到 PATC128122 與 PATC144588 表現於根部的皮層組織薄壁細胞上(圖 5.14、5.16)；葉片中兩基因則明顯表達於中肋的韌皮部上(圖 5.15、5.17)。

如果根據 RT-PCR 分析結果，PATC128122 在對照組的表現量應該很低，但 ISH 試驗中，對照組的根部皮層與葉片的韌皮部皆可偵測到 PATC128122 的表現(圖 5.14、5.15)，目前推測，ISH 主要是呈現 mRNA 轉錄表現之位置，但不能以兩處理之間(對照組與缺磷)的訊號顏色深淺代表表現量強弱；另外，也可能與雜交探針的專一性

(specificity)有關，影響原位雜交的結果。依照結果顯示，PATC128122 與 PATC144588 皆主要表現於根部的皮層組織與葉片的韌皮部，但有關於其代表的意義值得未來再進一步探討。



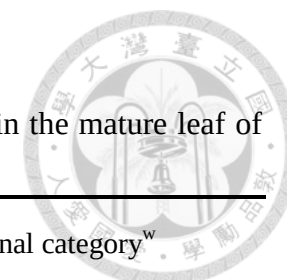


表 5.1. 由微矩陣分析結果中，挑出蝴蝶蘭成熟葉片內於缺磷下大量上調或下調之候選基因

Table 5.1. Selected genes from microarray data (Yu, 2012) showing notable up- or down- regulation by P starvation in the mature leaf of *Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3'.

| Probe ID                        | Fold change [treatment / +NPK] <sup>z</sup> |      |      |                   |      |      | Description <sup>x</sup>                                        | E-value | Arabidopsis homolog | Functional category <sup>w</sup>                                        |
|---------------------------------|---------------------------------------------|------|------|-------------------|------|------|-----------------------------------------------------------------|---------|---------------------|-------------------------------------------------------------------------|
|                                 | 0.1N                                        | 0N   | 0.1P | 0P                | 0.1K | 0K   |                                                                 |         |                     |                                                                         |
| Up-regulated candidates in leaf |                                             |      |      |                   |      |      |                                                                 |         |                     |                                                                         |
| PATC128122                      | -1.7                                        | -1.7 | 25.2 | 31.3 <sup>y</sup> | -1.7 | -1.6 | zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein             | 1E-26   | AT5G05830           | protein.degradation.ubiquitin.E3. RING                                  |
| PATC078157                      | 1.6                                         | 1.7  | 18.0 | 25.3              | 3.0  | 3.7  | hypothetical protein                                            | 1E-13   | -                   | -                                                                       |
| PATC155606                      | 1.4                                         | 1.9  | 15.6 | 22.4              | 2.7  | 3.1  | hypothetical protein                                            | 9E-76   | AT1G17710           | misc.acid and other phosphatases                                        |
| PATC126861                      | 1.3                                         | 1.6  | 9.5  | 10.3              | 1.6  | 1.9  | predicted protein                                               | 2E-61   | AT5G01220           | lipid metabolism.glycolipid synthesis.sulfolipid synthase               |
| PATC154300                      | -1.1                                        | 1.2  | 7.1  | 10.2              | 1.2  | -1.2 | predicted protein                                               | 2E-45   | AT5G01220           | lipid metabolism.glycolipid synthesis.sulfolipid synthase               |
| PATC129837                      | 1.2                                         | -1.2 | 9.5  | 6.9               | 1.3  | 1.1  | nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase                    | 0       | AT5G50400           | misc.acid and other phosphatases                                        |
| PATC156594                      | -1.7                                        | -1.4 | 4.1  | 6.1               | -1.4 | -1.2 | glycerol 3-phosphate permease                                   | 1E-172  | AT3G47420           | transporter.membrane system unknown                                     |
| PATC141818                      | -1.2                                        | -1.4 | 6.7  | 6.1               | 1.1  | -1.6 | purple acid phosphatase                                         | 1E-110  | AT3G17790           | misc.acid and other phosphatases                                        |
| PATC089322                      | -1.3                                        | 1.0  | 3.7  | 4.8               | 1.1  | 1.2  | pho1-like protein                                               | 1E-52   | AT1G68740           | transport.phosphate                                                     |
| PATC181362                      | 4.4                                         | 3.4  | 4.5  | 4.6               | 2.8  | 2.1  | hypothetical protein OsI_23501                                  | 4E-12   | -                   | -                                                                       |
| PATC139852                      | -1.2                                        | -1.2 | 3.9  | 4.5               | -1.2 | -1.2 | predicted protein                                               | 9E-62   | AT5G20150           | stress.abiotic                                                          |
| PATC138298                      | 3.0                                         | 1.7  | 6.6  | 3.7               | -1.6 | -1.6 | transcription factor                                            | 3E-83   | AT3G15510           | RNA.regulation of transcription.NAC domain transcription factor family  |
| PATC144588                      | 1.3                                         | 1.3  | 3.5  | 3.5               | 1.3  | -1.0 | phosphate transporter                                           | 0       | AT2G38940           | transport.phosphate                                                     |
| PATC151267                      | 2.6                                         | 1.4  | 12.7 | 3.5               | 2.2  | 1.7  | WRKY76 - superfamily of TFs having WRKY and zinc finger domains | 5E-49   | AT1G80840           | RNA.regulation of transcription.WRKY domain transcription factor family |
| PATC146454                      | 3.2                                         | 2.8  | 4.4  | 3.1               | 2.9  | 3.0  | predicted protein                                               | 0       | AT1G15520           | transport.ABC transporters and multidrug resistance systems             |



| Probe ID                          | Fold change [treatment / +NPK] <sup>z</sup> |      |       |      |       |       | Description <sup>x</sup>     | E-value | Arabidopsis homolog | Functional category <sup>w</sup> |
|-----------------------------------|---------------------------------------------|------|-------|------|-------|-------|------------------------------|---------|---------------------|----------------------------------|
|                                   | 0.1N                                        | 0N   | 0.1P  | 0P   | 0.1K  | 0K    |                              |         |                     |                                  |
| Table 5.1 continued               |                                             |      |       |      |       |       |                              |         |                     |                                  |
| down-regulated candidates in leaf |                                             |      |       |      |       |       |                              |         |                     |                                  |
| PATC153190                        | -2.5                                        | -4.9 | -7.6  | -7.4 | -5.6  | -7.3  | hypothetical protein         | 1E-154  | AT5G12010           | not assigned.unknown             |
| PATC133374                        | -6.0                                        | -5.5 | -5.6  | -6.2 | -5.1  | -5.6  | poly(A) polymerase, putative | 1E-110  | AT2G17580           | RNA.processing                   |
| PATC154014                        | -3.4                                        | -5.2 | -6.5  | -5.9 | -7.0  | -12.1 | predicted protein            | 3E-30   | AT3G29000           | signalling.calcium               |
| PATC063029                        | -2.9                                        | -5.7 | -10.3 | -4.8 | -11.6 | -10.4 | putative protein             | 5E-13   | -                   | -                                |

<sup>z</sup> These fold change data are collated from the gene expression under nitrogen (0.1N or 0N), phosphorus (0.1P or 0P), or potassium (0.1K or 0K) starvation.

<sup>y</sup> Significant differences (fold change  $\geq 3$  or fold change  $\leq -3$ ) are shown in bold and arranged by the order of that under 0P treatment.

<sup>x</sup> The description is followed by the annotation in Orchidstra database.

<sup>w</sup> The function of these genes were categorized by MapMan according to their homolog in *Arabidopsis*.

表 5.2. 由微矩陣分析結果中，挑出蝴蝶蘭根部內於缺磷下大量上調或下調之候選基因

Table 5.2. Selected genes from microarray data (Yu, 2012) showing notable up- or down- regulation by P starvation in the root of *Phalaenopsis Sogo Yukidian* 'V3'.

| Probe ID                        | Fold change [treatment / +NPK] <sup>z</sup> |      |      |                   |      |      | Description <sup>x</sup>                                                                                 | E-value | Arabidopsis homolog | Functional category <sup>w</sup>                                           |
|---------------------------------|---------------------------------------------|------|------|-------------------|------|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|---------------------|----------------------------------------------------------------------------|
|                                 | 0.1N                                        | 0N   | 0.1P | 0P                | 0.1K | 0K   |                                                                                                          |         |                     |                                                                            |
| Up-regulated candidates in root |                                             |      |      |                   |      |      |                                                                                                          |         |                     |                                                                            |
| PATC060903                      | -1.0                                        | 1.0  | -1.0 | 11.3 <sup>y</sup> | -1.0 | 1.4  | polyketide synthase                                                                                      | 2E-19   | -                   | -                                                                          |
| PATC145532                      | 9.0                                         | 4.9  | 6.6  | 8.0               | 7.3  | 10.0 | hypothetical protein                                                                                     | 0       | AT5G44790           | transport.metal                                                            |
| PATC128122                      | -2.2                                        | -1.6 | 6.9  | 6.1               | 2.3  | -1.9 | zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein                                                      | 1E-26   | AT5G05830           | protein.degradation.ubiquitin.E3. RING                                     |
| PATC167116                      | 2.0                                         | -1.2 | 2.1  | 5.7               | 2.3  | 1.6  | hypothetical protein                                                                                     | 2E-26   | -                   | -                                                                          |
| PATC045332                      | 7.0                                         | 1.9  | 5.2  | 5.0               | 5.9  | 4.9  | hypothetical protein                                                                                     | 3E-18   | -                   | -                                                                          |
| PATC045659                      | 4.8                                         | 1.9  | 3.9  | 4.6               | 1.3  | 3.3  | predicted protein                                                                                        | 8E-31   | AT4G08160           | not assigned.no ontology                                                   |
| PATC139613                      | 4.9                                         | -1.3 | 2.3  | 4.5               | 4.1  | 5.9  | hypothetical protein                                                                                     | 4E-33   | -                   | -                                                                          |
| PATC219670                      | 3.3                                         | 1.4  | 3.1  | 4.4               | 1.7  | 2.0  | hypothetical protein                                                                                     | 2E-20   | -                   | -                                                                          |
| PATC154300                      | 1.2                                         | 1.1  | 4.5  | 3.6               | 2.6  | 1.1  | predicted protein                                                                                        | 2E-45   | AT5G01220           | lipid metabolism.glycolipid synthesis.sulfolipid synthase                  |
| PATC159699                      | 4.1                                         | 4.0  | 4.5  | 3.2               | 2.5  | 2.1  | putative myb-related protein 1                                                                           | 6E-62   | AT1G56160           | RNA.regulation of transcription.MYB domain transcription factor family     |
| PATC071900                      | 2.1                                         | 1.3  | 21.2 | -1.3              | 1.1  | 4.7  | unnamed protein product                                                                                  | 5E-21   | AT5G48910           | not assigned.no ontology.pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein |
| PATC130846                      | 2.5                                         | 2.5  | 11.0 | 1.6               | 1.8  | 3.1  | Chain A, Resolution Of The Structure Of The Allergenic AndAntifungal Banana Fruit Thaumatin-Like Protein | 2E-84   | AT4G11650           | stress.abiotic                                                             |
| PATC072900                      | -1.0                                        | 1.0  | 9.2  | -1.0              | -1.0 | 2.0  | predicted protein                                                                                        | 9E-32   | AT5G56150           | protein.degradation.ubiquitin.E2                                           |
| PATC089322                      | 1.3                                         | 2.1  | 6.0  | 1.7               | 1.6  | 3.7  | pho1-like protein                                                                                        | 1E-52   | AT1G68740           | transport.phosphate                                                        |

| Probe ID                          | Fold change [treatment / +NPK] <sup>z</sup> |      |       |       |      |       | Description <sup>x</sup>                                  | E-value | Arabidopsis homolog | Functional category <sup>w</sup>                                                                       |
|-----------------------------------|---------------------------------------------|------|-------|-------|------|-------|-----------------------------------------------------------|---------|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                   | 0.1N                                        | 0N   | 0.1P  | 0P    | 0.1K | 0K    |                                                           |         |                     |                                                                                                        |
| Table 5.2 continued               |                                             |      |       |       |      |       |                                                           |         |                     |                                                                                                        |
| PATC116924                        | -1.3                                        | -2.0 | 4.9   | 1.9   | -1.2 | -1.3  | myb-like DNA-binding domain, SHAQKYF class family protein | 1E-21   | AT2G38300           | RNA.regulation of transcription.G2-like transcription factor family, GARP                              |
| PATC132945                        | 1.5                                         | 1.2  | 4.4   | -1.1  | 1.1  | 1.1   | hypothetical protein                                      | 2E-57   | AT4G13420           | transport.potassium                                                                                    |
| Down-regulated candidates in root |                                             |      |       |       |      |       |                                                           |         |                     |                                                                                                        |
| PATC068059                        | -4.7                                        | -2.0 | -18.1 | -17.3 | 1.3  | -1.7  | unnamed protein product                                   | 7E-18   | -                   | -                                                                                                      |
| PATC105076                        | -5.9                                        | -4.0 | -17.3 | -10.6 | -1.0 | -3.0  | Aspartic proteinase nepenthesin-1 precursor, putative     | 1E-20   | -                   | -                                                                                                      |
| PATC231430                        | -3.4                                        | -3.4 | -6.4  | -9.4  | -3.6 | -10.9 | calmodulin binding family protein                         | 2E-12   | -                   | -                                                                                                      |
| PATC225601                        | -3.5                                        | -4.2 | -4.7  | -8.0  | -4.2 | -6.3  | calmodulin binding protein, putative                      | 2E-26   | AT3G58480           | signalling.calcium                                                                                     |
| PATC073314                        | -2.5                                        | -4.5 | -4.9  | -7.7  | -5.4 | -5.8  | AP2 domain CBF protein                                    | 2E-21   | AT5G51990           | RNA.regulation of transcription.AP2/EREBP, APETALA2/Ethylene-responsive element binding protein family |

<sup>z</sup> These fold change data are collated from the gene expression under nitrogen (0.1N or 0N), phosphorus (0.1P or 0P), or potassium (0.1K or 0K) starvation.

<sup>y</sup> Significant differences (fold change  $\geq 3$  or fold change  $\leq -3$ ) are shown in bold and arranged by the order of that under 0P treatment.

<sup>x</sup> The description is followed by the annotation in Orchidstra database.

<sup>w</sup> The function of these genes were categorized by MapMan according to their homolog in *Arabidopsis*.

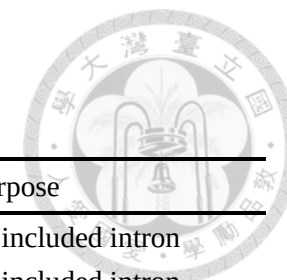
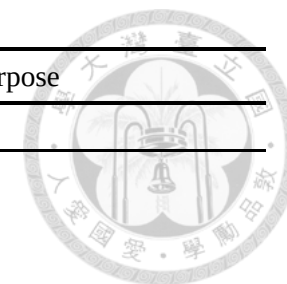


表 5.3. 基因表達驗證及基因構築所用之引子

Table 5.3. Primers used for validation of gene expression and gene constructs.

| Primer name             | Sequence (5' → 3')          | Direction | T <sub>m</sub> (°C) | Purpose                            |
|-------------------------|-----------------------------|-----------|---------------------|------------------------------------|
| PaActin-GF (PATC157348) | GAGACTTTCAACGTGCCTGC        | F         | 56.7                | housekeeping gene, included intron |
| PaActin-GR (PATC157348) | GCAGTACGAAACAGAAGCCA        | R         | 55.4                | housekeeping gene, included intron |
| PaActin-NF (PATC157348) | ATGAGGGTTATGCACTTCCTCATGC   | F         | 59.1                | housekeeping gene, excluded intron |
| PaActin-NR (PATC157348) | TCCAATCCAGACACTGTATTTCTCTCT | R         | 58.8                | housekeeping gene, excluded intron |
| PATC045332 RT_L         | TTCCATGCAGTGGGATTACA        | F         | 54                  | RT-PCR, validation                 |
| PATC045332 RT_R         | GTGGGATGACTGTGCCTTTC        | R         | 56.1                | RT-PCR, validation                 |
| PATC045659 RT_L         | GGGTTTCTGGGAGTTGTTCA        | F         | 55                  | RT-PCR, validation                 |
| PATC045659 RT_R         | AAGTGCCATGAAATCCTCTGA       | R         | 54.1                | RT-PCR, validation                 |
| PATC060903 RT_L         | GGCATGATGAATACCGCTTT        | F         | 53.4                | RT-PCR, validation                 |
| PATC060903 RT_R         | GAGCCGGTGATAAGTTCCAG        | R         | 55.3                | RT-PCR, validation                 |
| PATC063029 RT_L         | GGTCTCTTCTCGAATGGCTC        | F         | 55                  | RT-PCR, validation                 |
| PATC063029 RT_R         | TTGGTGGGATCGAGAAACTC        | R         | 54.4                | RT-PCR, validation                 |
| PATC068059 RT_L         | GTCGGATGGATTTGTGTAG         | F         | 50.4                | RT-PCR, validation                 |
| PATC068059 RT_R         | TGACAGGTTAAATGGCATGA        | R         | 51.9                | RT-PCR, validation                 |
| PATC071900 RT_L         | GCTGTGTCCTTCGGTCTCAT        | F         | 57                  | RT-PCR, validation                 |
| PATC071900 RT_R         | ACGGGTTGATCCAAACTGAC        | R         | 55.2                | RT-PCR, validation                 |
| PATC072900 RT_L         | TGTCTCCCTCCTCAACCACT        | F         | 57.6                | RT-PCR, validation                 |
| PATC072900 RT_R         | AGTCGGTAGGGAAAGCAATG        | R         | 54.8                | RT-PCR, validation                 |
| PATC073314 RT_L         | ATATGGCTCGGCACTTATCC        | F         | 54.5                | RT-PCR, validation                 |
| PATC073314 RT_R         | AAAGTCCACGCAGAATCAGG        | R         | 55.2                | RT-PCR, validation                 |
| PATC078157 RT_L         | GTGGAGAGGAGGGAGGAGAG        | F         | 58.2                | RT-PCR, validation                 |
| PATC078157 RT_R         | CAGTTATCGCTGTCGCAGTC        | R         | 55.9                | RT-PCR, validation                 |



| Primer name                | Sequence (5' → 3')       | Direction | T <sub>m</sub> (°C) | Purpose                          |
|----------------------------|--------------------------|-----------|---------------------|----------------------------------|
| <b>Table 5.3 continued</b> |                          |           |                     |                                  |
| PATC089322 RT_L            | GATGTCAAGCACAGCAACTG     | F         | 54.5                | RT-PCR, validation               |
| PATC089322 RT_R            | AGAGTGCTCTTCCATCATCG     | R         | 54.2                | RT-PCR, validation               |
| PATC105076 RT_L            | GACGATGAGACATTGCAGGA     | F         | 54.7                | RT-PCR, validation               |
| PATC105076 RT_R            | CAAAGCCAGACACAGCACAT     | R         | 56                  | RT-PCR, validation               |
| PATC116924 RT_L            | GGCTGACGATGATGATGATG     | F         | 53.4                | RT-PCR, validation               |
| PATC116924 RT_R            | GCACTGGACTTCGGAATACTG    | R         | 55.5                | RT-PCR, validation               |
| PATC126861 RT_L            | TGTCTTCGTTATGCCGTCAG     | F         | 54.9                | RT-PCR, validation               |
| PATC126861 RT_R            | CTCCTTCCTTCCACTCTCCA     | R         | 55.8                | RT-PCR, validation               |
| PATC128122 3'+713          | CACAGTTTCATTACCGGAGCTAGC | R         | 58                  | RT-PCR for validation, construct |
| PATC128122 5'-344          | GCTCCAACGCCATTTTATAGAC   | F         | 55.2                | RT-PCR for validation, construct |
| PATC128122 insitu3' +259   | ATTGGAACGCCTAGTTCCTG     | R         | 54.8                | clone probe                      |
| PATC128122 insitu5' +65    | CAGACGAACGGCATTGTAA      | F         | 53.4                | clone probe                      |
| PATC129837 RT_L            | TGGAGGTGAATGTGGAGTTG     | F         | 54.7                | RT-PCR, validation               |
| PATC129837 RT_R            | CCATTCAGCAGCTTCATCAG     | R         | 53.9                | RT-PCR, validation               |
| PATC130846 RT_L            | CAATGCTCTGATGCCGTCT      | F         | 55.3                | RT-PCR, validation               |
| PATC130846 RT_R            | AATAGTCCGTCGCCTGGTAGC    | R         | 58.9                | RT-PCR, validation               |
| PATC132945 RT_L            | CCCACGTGTGACCATGATT      | F         | 55.2                | RT-PCR, validation               |
| PATC132945 RT_R            | GAAGGCTGAGATTGCAAAGG     | R         | 54.1                | RT-PCR, validation               |
| PATC133374 RT_L            | TGGCTAGGATTGTTGGCTTT     | F         | 54.6                | RT-PCR, validation               |
| PATC133374 RT_R            | GGGCTTGAGCTGATAATGGA     | R         | 54.7                | RT-PCR, validation               |
| PATC138298 RT_L            | AAGACTCCGCCGTAGATGAA     | F         | 55.7                | RT-PCR, validation               |
| PATC138298 RT_R            | CCTAACCTCCCAGATTTCCA     | R         | 53.8                | RT-PCR, validation               |
| PATC139613 RT_L            | TCGGTAAAGGGTCTGTTGCT     | F         | 56.2                | RT-PCR, validation               |
| PATC139613 RT_R            | CGAACGATGATCCTGAATGA     | R         | 52.2                | RT-PCR, validation               |

| Primer name                | Sequence (5' → 3')     | Direction | T <sub>m</sub> (°C) | Purpose                         |
|----------------------------|------------------------|-----------|---------------------|---------------------------------|
| <b>Table 5.3 continued</b> |                        |           |                     |                                 |
| PATC139852 RT_L            | TCCGACTTCCTTTCATCCAG   | F         | 54.2                | RT-PCR, validation              |
| PATC139852 RT_R            | CCTCAGCTATTCGGCAACTT   | R         | 55                  | RT-PCR, validation              |
| PATC141818 RT_L            | CCAGCACATTAGCAGCAGAG   | F         | 56.1                | RT-PCR, validation              |
| PATC141818 RT_R            | GGGCCTAGTGCAATTATGGA   | R         | 54.7                | RT-PCR, validation, clone probe |
| PATC144588 5'+966          | CTTTAGCGCCATAGGATGGA   | F         | 54.4                | clone probe                     |
| PATC144588 RT_L            | GGAACAGGACAAGGTGGAGA   | F         | 56.5                | RT-PCR, validation              |
| PATC144588 RT_R            | GAAAGTTAGCCCGTACATCACC | R         | 55.6                | RT-PCR, validation              |
| PATC145532 RT_L            | GAGGCAGCAGTTGTTGTTGA   | F         | 55.9                | RT-PCR, validation              |
| PATC145532 RT_R            | CCTGGGCTTCCTATACCTTCT  | R         | 55.7                | RT-PCR, validation              |
| PATC146454 RT_L            | ACTCTGCATGGCTTCGACTT   | F         | 56.8                | RT-PCR, validation              |
| PATC146454 RT_R            | ATCTTGTGAGCCAGGAGACG   | R         | 56.8                | RT-PCR, validation              |
| PATC151267 RT_L            | AATCTGATAGCCGCAACGAC   | F         | 55.3                | RT-PCR, validation              |
| PATC151267 RT_R            | CAAAGAAAGTGGGTGCTGCT   | R         | 56                  | RT-PCR, validation              |
| PATC153190 RT_L            | GCAAGCACCTATCATGGTT    | F         | 55.4                | RT-PCR, validation              |
| PATC153190 RT_R            | TCTGGTATGGATGGCCTCTC   | R         | 56                  | RT-PCR, validation              |
| PATC154014 RT_L            | TGTGAATGGTGATGGGAAGA   | F         | 53.7                | RT-PCR, validation              |
| PATC154014 RT_R            | TAAAGCCGGATTTCCTTCCT   | R         | 53.8                | RT-PCR, validation              |
| PATC154300 RT_L            | AGCCCTCTCTTTCCTCCTC    | F         | 55.9                | RT-PCR, validation              |
| PATC154300 RT_R            | ATGACTCCCGGCGAACAA     | R         | 56.9                | RT-PCR, validation              |
| PATC155606 RT_L            | GCTTCACCGAGATCAACACA   | F         | 55.1                | RT-PCR, validation              |
| PATC155606 RT_R            | GACCAACCGGATCTACAGAA   | R         | 53.9                | RT-PCR, validation              |
| PATC156594 RT_L            | GTGGAGTGATTGGAGGCATT   | F         | 55.1                | RT-PCR, validation              |
| PATC156594 RT_R            | CACAAGCCTGGTCAATAGCA   | R         | 55.3                | RT-PCR, validation              |
| PATC159699 RT_L            | CACAAGGGCTCATGGACTC    | F         | 55.6                | RT-PCR, validation              |

| Primer name                | Sequence (5' → 3')   | Direction | Tm (°C) | Purpose            |
|----------------------------|----------------------|-----------|---------|--------------------|
| <b>Table 5.3 continued</b> |                      |           |         |                    |
| PATC159699 RT_R            | TGCTTCACACGCTTCTTCAG | R         | 55.6    | RT-PCR, validation |
| PATC167116 RT_L            | GACGCACTGACGATAGCAAG | F         | 55.9    | RT-PCR, validation |
| PATC167116 RT_R            | TGGACAGTGATGGAGCTGAC | R         | 56.8    | RT-PCR, validation |
| PATC181362 RT_L            | CTCTGGATCTCCGGTCTGTC | F         | 56.5    | RT-PCR, validation |
| PATC181362 RT_R            | CCAAAACCTTGAGAACAGAG | R         | 51.1    | RT-PCR, validation |
| PATC219670 RT_L            | TTCAAACACAGCCGAGACAG | F         | 55.3    | RT-PCR, validation |
| PATC219670 RT_R            | TGAGGCGAACTTGGTCTATG | R         | 54.4    | RT-PCR, validation |
| PATC225601 RT_L            | AGTATCTTGGCCCGGTGAGT | F         | 58.2    | RT-PCR, validation |
| PATC225601 RT_R            | AAGCCTCCCTTTCTTTCTGC | R         | 55.3    | RT-PCR, validation |
| PATC231430 RT_L            | CGCATCGGTTATGTGAGGA  | F         | 54.7    | RT-PCR, validation |
| PATC231430 RT_R            | AACGGCCTTGAAATACCAGA | R         | 54.2    | RT-PCR, validation |

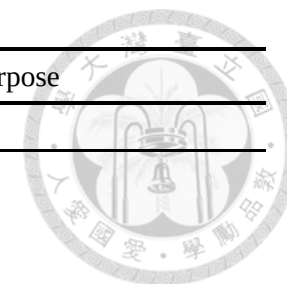


表 5.4. 候選基因分別在微矩陣及 RT-PCR 驗證結果中的表現量倍數差異之比較

Table 5.4. Comparison of the expression of selected genes between microarray and RT-PCR analyses and normalized with the expression of actin.

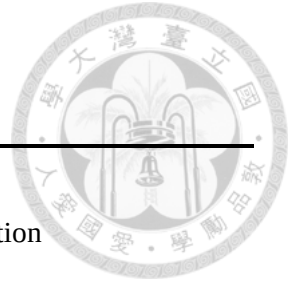
| probe ID                                                                                                                                                                                                                          | Microarray           |      | # Quantitative analysis in leaf, by RT-PCR |     |        |     |          |     |        |      | Microarray           |       | # Quantitative analysis in root, by RT-PCR |     |        |     |          |     |        |      | contig length | amplicon length      | <div><div></div><div>0.116</div></div> Description              |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|------|--------------------------------------------|-----|--------|-----|----------|-----|--------|------|----------------------|-------|--------------------------------------------|-----|--------|-----|----------|-----|--------|------|---------------|----------------------|-----------------------------------------------------------------|
|                                                                                                                                                                                                                                   | Fold change          |      | 8 weeks                                    |     |        |     | 12 weeks |     |        |      | Fold change          |       | 8 weeks                                    |     |        |     | 12 weeks |     |        |      |               |                      |                                                                 |
|                                                                                                                                                                                                                                   | in <i>Phal.</i> leaf |      | Expt.1                                     |     | Expt.2 |     | Expt.1   |     | Expt.2 |      | in <i>Phal.</i> root |       | Expt.1                                     |     | Expt.2 |     | Expt.1   |     | Expt.2 |      |               |                      |                                                                 |
|                                                                                                                                                                                                                                   | 0.1P                 | 0P   | 0.1P                                       | 0P  | 0.1P   | 0P  | 0.1P     | 0P  | 0.1P   | 0P   | 0.1P                 | 0P    | 0.1P                                       | 0P  | 0.1P   | 0P  | 0.1P     | 0P  | 0.1P   | 0P   |               |                      |                                                                 |
| Up-regulated candidates in leaf and root                                                                                                                                                                                          |                      |      |                                            |     |        |     |          |     |        |      |                      |       |                                            |     |        |     |          |     |        |      |               |                      |                                                                 |
| PATC128122                                                                                                                                                                                                                        | 25.2                 | 31.3 | 1.3                                        | 1.6 | 1.0    | 1.8 | 0.8      | 7.2 | 1.3    | 9.0  | 6.9                  | 6.1   | 0.5                                        | 0.5 | 0.9    | 1.0 | 1.0      | 9.7 | 1.2    | 2.8  | 1083          | 214                  | zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein             |
| PATC154300                                                                                                                                                                                                                        | 7.1                  | 10.2 | 5.0                                        | 5.4 | 0.8    | 1.4 | 3.6      | 6.6 | 1.4    | 13.0 | 4.5                  | 3.6   | 2.1                                        | 1.4 | 1.7    | 1.2 | 1.5      | 2.1 | 0.9    | 2.8  | 500           | 457                  | predicted protein                                               |
| Up-regulated candidates in leaf                                                                                                                                                                                                   |                      |      |                                            |     |        |     |          |     |        |      |                      |       |                                            |     |        |     |          |     |        |      |               |                      |                                                                 |
| PATC155606                                                                                                                                                                                                                        | 15.6                 | 22.4 | 1.5                                        | 1.5 | 1.2    | 2.6 | 1.5      | 2.1 | 1.5    | 3.6  | 2.8                  | 2.4   | 1.3                                        | 1.4 | 1.3    | 1.2 | 1.0      | 1.2 | 1.8    | 1206 | 497           | hypothetical protein |                                                                 |
| PATC126861                                                                                                                                                                                                                        | 9.5                  | 10.3 | 1.7                                        | 1.6 | 0.8    | 1.9 | 1.3      | 1.5 | 2.1    | 3.6  | 4.3                  | 2.9   | 1.5                                        | 1.5 | 1.4    | 1.3 | 1.2      | 1.4 | 1.1    | 1.4  | 706           | 457                  | predicted protein                                               |
| PATC129837                                                                                                                                                                                                                        | 9.5                  | 6.9  | 1.2                                        | 1.5 | 1.2    | 2.5 | 1.3      | 1.9 | 2.2    | 4.3  | 3.9                  | 2.0   | 1.6                                        | 2.0 | 1.5    | 0.9 | 1.6      | 1.7 | 1.3    | 1.4  | 2033          | 505                  | nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase                    |
| PATC156594                                                                                                                                                                                                                        | 4.1                  | 6.1  | 1.4                                        | 1.6 | 0.9    | 1.6 | 1.6      | 2.1 | 2.0    | 4.3  | 1.8                  | 2.0   | 1.2                                        | 1.2 | 1.3    | 1.2 | 0.7      | 0.8 | 1.2    | 1.9  | 1999          | 416                  | glycerol 3-phosphate permease                                   |
| PATC141818                                                                                                                                                                                                                        | 6.7                  | 6.1  | 1.2                                        | 1.8 | 0.8    | 1.6 | 1.8      | 3.2 | 1.7    | 3.0  | 4.4                  | 2.0   | 1.3                                        | 1.3 | 1.3    | 1.0 | 1.4      | 1.4 | 1.2    | 1.7  | 1713          | 574                  | purple acid phosphatase                                         |
| PATC089322                                                                                                                                                                                                                        | 3.7                  | 4.8  | 2.4                                        | 4.5 | 2.2    | 4.9 | 5.3      | 7.1 | 4.0    | 7.4  | 6.0                  | 1.7   | *                                          |     |        |     |          |     |        |      | 530           | 390                  | pho1-like protein                                               |
| PATC139852                                                                                                                                                                                                                        | 3.9                  | 4.5  | 1.3                                        | 1.3 | 0.9    | 2.0 | 1.5      | 1.9 | 1.6    | 4.2  | 3.0                  | 2.3   | 1.3                                        | 1.5 | 1.3    | 1.1 | 1.2      | 1.6 | 1.0    | 2.4  | 1579          | 416                  | predicted protein                                               |
| PATC138298                                                                                                                                                                                                                        | 6.6                  | 3.7  | 2.1                                        | 2.1 | 0.4    | 1.7 | 0.7      | 0.7 | 2.9    | 4.1  | -                    | -     | 0.8                                        | 1.4 | 1.0    | 0.6 | 1.0      | 0.8 | 0.7    | 1.0  | 1106          | 533                  | transcription factor                                            |
| PATC144588                                                                                                                                                                                                                        | 3.5                  | 3.5  | 1.2                                        | 1.2 | 0.9    | 0.6 | 1.0      | 1.3 | 1.2    | 1.7  | 2.2                  | 2.3   | 0.9                                        | 1.2 | 1.3    | 1.2 | 0.9      | 1.1 | 0.9    | 1.5  | 2430          | 442                  | phosphate transporter                                           |
| PATC151267                                                                                                                                                                                                                        | 12.7                 | 3.5  | 0.9                                        | 0.6 | 0.8    | 2.0 | 0.2      | 0.5 | 0.9    | 0.8  | -                    | -     | 1.2                                        | 0.7 | 1.5    | 0.9 | 1.2      | 1.5 | 0.9    | 1.0  | 1128          | 702                  | WRKY76 - superfamily of TFs having WRKY and zinc finger domains |
| Down-regulated candidates in leaf                                                                                                                                                                                                 |                      |      |                                            |     |        |     |          |     |        |      |                      |       |                                            |     |        |     |          |     |        |      |               |                      |                                                                 |
| PATC153190                                                                                                                                                                                                                        | -7.6                 | -7.4 | 1.1                                        | 0.9 | 0.9    | 1.3 | 0.9      | 1.1 | 1.1    | 1.4  | -2.2                 | -2.4  | 0.8                                        | 0.7 | 1.0    | 0.7 | 1.1      | 1.1 | 0.9    | 0.8  | 2656          | 490                  | hypothetical protein                                            |
| PATC154014                                                                                                                                                                                                                        | -6.5                 | -5.9 | 0.7                                        | 0.7 | 1.0    | 1.2 | 1.0      | 1.3 | 1.6    | 0.9  | -                    | -     | 1.0                                        | 1.1 | 0.9    | 0.8 | 0.8      | 0.8 | 0.9    | 1.0  | 710           | 194                  | predicted protein                                               |
| PATC063029                                                                                                                                                                                                                        | -10.3                | -4.8 | 0.8                                        | 0.7 | 1.1    | 2.4 | 1.0      | 0.7 | 1.3    | 1.3  | -1.5                 | -1.3  | 0.8                                        | 0.8 | 0.6    | 0.8 | 1.3      | 1.1 | 1.9    | 0.8  | 267           | 147                  | putative protein                                                |
| Up-regulated candidates in root                                                                                                                                                                                                   |                      |      |                                            |     |        |     |          |     |        |      |                      |       |                                            |     |        |     |          |     |        |      |               |                      |                                                                 |
| PATC145532                                                                                                                                                                                                                        | -                    | -    | 0.9                                        | 0.8 | 0.9    | 1.1 | 1.0      | 1.1 | 1.1    | 1.2  | 6.6                  | 8.0   | 1.0                                        | 1.0 | 1.1    | 0.8 | 0.9      | 1.0 | 1.1    | 1.2  | 3264          | 543                  | hypothetical protein                                            |
| PATC167116                                                                                                                                                                                                                        | -                    | -    | *                                          |     |        |     |          |     |        |      | 2.1                  | 5.7   | 1.6                                        | 1.2 | 1.1    | 1.0 | 1.4      | 1.8 | 1.0    | 0.8  | 375           | 154                  | predicted protein                                               |
| PATC045332                                                                                                                                                                                                                        | -                    | -    | *                                          |     |        |     |          |     |        |      | 5.2                  | 5.0   | 0.9                                        | 0.7 | 1.3    | 0.9 | 2.6      | 2.7 | 2.3    | 1.3  | 421           | 114                  | hypothetical protein                                            |
| PATC045659                                                                                                                                                                                                                        | -                    | -    | 1.2                                        | 0.9 | 0.9    | 1.2 | 0.9      | 0.8 | 1.4    | 1.1  | 3.9                  | 4.6   | 1.6                                        | 1.4 | 1.3    | 0.9 | 2.2      | 2.4 | 1.0    | 1.1  | 346           | 173                  | predicted protein                                               |
| PATC139613                                                                                                                                                                                                                        | -                    | -    | 0.9                                        | 0.7 | 1.9    | 1.7 | 1.0      | 1.0 | 1.4    | 1.6  | 2.3                  | 4.5   | 1.0                                        | 1.0 | 1.1    | 0.8 | 1.4      | 1.2 | 1.1    | 0.4  | 954           | 153                  | hypothetical protein                                            |
| PATC219670                                                                                                                                                                                                                        | -                    | -    | 0.9                                        | 0.8 | 1.1    | 1.8 | 0.9      | 1.3 | 1.2    | 1.8  | 3.1                  | 4.4   | 1.2                                        | 1.1 | 1.3    | 1.0 | 1.0      | 1.0 | 1.0    | 1.0  | 482           | 195                  | hypothetical protein                                            |
| PATC159699                                                                                                                                                                                                                        | -                    | -    | *                                          |     |        |     |          |     |        |      | 4.5                  | 3.2   | 0.7                                        | 0.9 | 1.0    | 1.1 | 2.1      | 2.4 | 0.8    | 0.5  | 382           | 317                  | putative myb-related protein 1                                  |
| PATC071900                                                                                                                                                                                                                        | -                    | -    | 0.8                                        | 1.0 | 0.7    | 2.0 | 0.8      | 0.9 | 1.0    | 0.8  | 21.2                 | -1.3  | 1.0                                        | 0.6 | 1.9    | 1.6 | 1.1      | 1.3 | 1.7    | 1.2  | 434           | 379                  | unnamed protein product                                         |
| Down-regulated candidates in root                                                                                                                                                                                                 |                      |      |                                            |     |        |     |          |     |        |      |                      |       |                                            |     |        |     |          |     |        |      |               |                      |                                                                 |
| PATC105076                                                                                                                                                                                                                        | -                    | -    | 0.4                                        | 0.2 | 1.3    | 3.0 | 1.4      | 2.0 | 1.1    | 0.9  | -17.3                | -10.6 | 1.0                                        | 1.3 | 1.5    | 1.1 | 0.9      | 0.9 | 1.0    | 1.1  | 488           | 228                  | hypothetical protein                                            |
| PATC231430                                                                                                                                                                                                                        | -                    | -    | *                                          |     |        |     |          |     |        |      | -6.4                 | -9.4  | 1.0                                        | 1.0 | 0.9    | 0.9 | 0.9      | 1.2 | 0.9    | 0.9  | 262           | 102                  | predicted protein                                               |
| PATC225601                                                                                                                                                                                                                        | -                    | -    | *                                          |     |        |     |          |     |        |      | -4.7                 | -8.0  | *                                          |     |        |     |          |     |        |      | 448           | 124                  | hypothetical protein                                            |
| PATC073314                                                                                                                                                                                                                        | -                    | -    | 0.8                                        | 0.6 | 0.8    | 1.4 | 1.1      | 1.1 | 1.5    | 1.6  | -4.9                 | -7.7  | 1.3                                        | 0.7 | 0.7    | 0.9 | 1.0      | 1.4 | 1.2    | 0.7  | 374           | 116                  | AP2 domain CBF protein                                          |
| -, fold change is not shown in microarray data. *, the band is week in gel electrophoresis analysis. #, the pixels of band are calculated by [(treatment/background) / (control/background) ], and the actin pixel is background. |                      |      |                                            |     |        |     |          |     |        |      |                      |       |                                            |     |        |     |          |     |        |      |               |                      |                                                                 |

-, fold change is not shown in microarray data. \*, the band is week in gel electrophoresis analysis. #, the pixels of band are calculated by [(treatment/background) / (control/background)], and the actin pixel is background.



表 5.5. 無法以 RT-PCR 擴增出產物的候選基因

Table 5.5. Genes failed to be amplified by RT-PCR.



| Probe ID    | Microarray                       |      | Microarray                       |       | Contig length | Amplicon length | Description                                                                                              |
|-------------|----------------------------------|------|----------------------------------|-------|---------------|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|             | Fold change in <i>Phal.</i> leaf |      | Fold change in <i>Phal.</i> root |       |               |                 |                                                                                                          |
|             | 0.1P                             | 0P   | 0.1P                             | 0P    |               |                 |                                                                                                          |
| PATC078157  | 18.0                             | 25.3 | 2.5                              | 2.6   | 204           | 110             | hypothetical protein                                                                                     |
| PATC181362  | 4.5                              | 4.6  | -                                | -     | 247           | 228             | hypothetical protein                                                                                     |
| *PATC146454 | 4.4                              | 3.1  | -                                | -     | 4592          | 498             | predicted protein                                                                                        |
| PATC133374  | -5.6                             | -6.2 | -                                | -     | 1734          | 316             | poly(A) polymerase, putative                                                                             |
| PATC060903  | -                                | -    | -1.0                             | 11.3  | 200           | 155             | Polyketide synthase                                                                                      |
| PATC116924  | -                                | -    | 4.9                              | 1.9   | 396           | 287             | myb-like DNA-binding domain, SHAQKYF class family protein                                                |
| PATC130846  | -                                | -    | 11.0                             | 1.6   | 882           | 478             | Chain A, Resolution Of The Structure Of The Allergenic AndAntifungal Banana Fruit Thaumatin-Like Protein |
| *PATC072900 | -                                | -    | 9.2                              | -1.0  | 302           | 243             | predicted protein                                                                                        |
| PATC132945  | -                                | -    | 4.4                              | -1.1  | 468           | 334             | hypothetical protein                                                                                     |
| PATC068059  | -                                | -    | -18.1                            | -17.3 | 209           | 111             | unnamed protein product                                                                                  |

\*, Incorrectly amplified length.

-, Fold change is not shown in microarray data.

表 5.6. 11 天大的阿拉伯芥野生株與 35S::PATC128122 轉植株，在不同磷肥供應條件下的地上部與地下部鮮重

Table 5.6. Shoot and root fresh weight of the 11-d-old *Arabidopsis thaliana* wild type and 35S::PATC128122 transgenic lines grown under various Pi supply conditions (250, 50 or 10  $\mu$ M).

| Plants<br>(Wild type and<br>35S::PATC128122<br>lines) | Shoot fresh weight (mg)             |       |       | Root fresh weight (mg) |         |        |
|-------------------------------------------------------|-------------------------------------|-------|-------|------------------------|---------|--------|
|                                                       | P treatment ( $\mu$ M) <sup>z</sup> |       |       | P treatment ( $\mu$ M) |         |        |
|                                                       | 250                                 | 50    | 10    | 250                    | 50      | 10     |
| Wild type                                             | 5.3 b <sup>y</sup>                  | 5.6 a | 3.6 a | 1.8 b                  | 2.2 ab  | 2.1 ab |
| 1                                                     | 5.7 b                               | 5.1 a | 3.8 a | 1.7 b                  | 1.9 cde | 1.9 ab |
| 2                                                     | 5.4 b                               | 4.8 a | 3.6 a | 1.8 b                  | 2.0 bcd | 2.1 a  |
| 3                                                     | 5.2 b                               | 5.2 a | 4.1 a | 1.9 b                  | 1.9 cde | 2.3 a  |
| 4                                                     | 5.2 b                               | 5.3 a | 3.9 a | 2.0 b                  | 2.1 bc  | 2.1 a  |
| 5                                                     | 5.8 b                               | 5.3 a | 4.1 a | 2.0 b                  | 1.8 de  | 2.0 ab |
| 7                                                     | 5.9 b                               | 5.9 a | 3.6 a | 2.5 a                  | 2.6 a   | 2.4 a  |
| 8                                                     | 5.3 b                               | 5.1 a | 4.1 a | 1.8 b                  | 2.2 bc  | 1.6 b  |
| 10                                                    | 5.7 b                               | 5.1 a | 3.6 a | 2.1 b                  | 1.9 cde | 1.9 ab |
| 16                                                    | 7.1 a                               | 5.2 a | 3.8 a | 2.7 a                  | 1.7 e   | 1.9 ab |
| Significance <sup>x</sup>                             | *                                   | NS    | NS    | ***                    | **      | NS     |

<sup>z</sup> The 5-d-old seedlings were transferred to new agar plates containing 250, 50, or 10  $\mu$ M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> for additional 6 days.

<sup>y</sup> Means followed by a different letter in columns represent significant differences at  $P \leq 0.05$  by LSD test.

<sup>x</sup> NS indicates no significant difference within columns. \*, \*\*and \*\*\* indicate significant differences according to ANOVA test at  $P \leq 0.05$ , 0.01 or 0.001, respectively; n = 3.

表 5.7. 11 天大的阿拉伯芥野生株與 35S::PATC128122 轉植株，在不同磷肥供應條件下的地上部與地下部無機磷濃度

Table 5.7. Shoot and root Pi concentrations of the 11-d-old *Arabidopsis thaliana* wild type and 35S::PATC128122 transgenic lines grown under various Pi supply conditions (250, 50 or 10  $\mu\text{M}$ ).

| Plants<br>(Wild type and<br>35S::PATC128122<br>lines) | Shoot Pi concentration<br>(nmole /mg FW)   |       |      | Root Pi concentration<br>(nmole /mg FW) |        |      |
|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-------|------|-----------------------------------------|--------|------|
|                                                       | P treatment ( $\mu\text{M}$ ) <sup>z</sup> |       |      | P treatment ( $\mu\text{M}$ )           |        |      |
|                                                       | 250                                        | 50    | 10   | 250                                     | 50     | 10   |
| Wild type                                             | 10.4bcd <sup>y</sup>                       | 3.6b  | 1.2a | 4.8abc                                  | 2.8ab  | 1.7a |
| 1                                                     | 11.8a                                      | 4.9ab | 1.3a | 4.9ab                                   | 2.7ab  | 1.7a |
| 2                                                     | 10.5abc                                    | 5.2a  | 1.2a | 4.9a                                    | 2.9a   | 1.6a |
| 3                                                     | 11.4ab                                     | 5.2a  | 1.3a | 4.7abcd                                 | 2.7ab  | 1.6a |
| 4                                                     | 10.7abc                                    | 4.6ab | 1.3a | 4.5bcde                                 | 2.6abc | 1.5a |
| 5                                                     | 10.2bcd                                    | 5.3a  | 1.3a | 4.4cde                                  | 2.7ab  | 1.5a |
| 7                                                     | 10.1bcd                                    | 4.0ab | 1.2a | 4.3e                                    | 2.2c   | 1.5a |
| 8                                                     | 10.0cd                                     | 4.9ab | 1.4a | 4.4de                                   | 2.6abc | 1.7a |
| 10                                                    | 8.6e                                       | 4.1ab | 1.3a | 4.2e                                    | 2.7ab  | 1.5a |
| 16                                                    | 9.0de                                      | 4.6ab | 1.0a | 4.2e                                    | 2.4bc  | 1.6a |
| Significance <sup>x</sup>                             | **                                         | NS    | NS   | **                                      | NS     | NS   |

<sup>z</sup> The 5-d-old seedlings were transferred to new agar plates containing 250, 50, or 10  $\mu\text{M}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$  for additional 6 days.

<sup>y</sup> Means followed by a different letter in columns represent significant differences at  $P \leq 0.05$  by LSD test.

<sup>x</sup> NS indicates no significant difference within columns. \* and \*\* indicate significant differences according to ANOVA test at  $P \leq 0.05$ , and  $P \leq 0.01$ , respectively; n = 3.

表 5.8. 11 天大的阿拉伯芥野生株與 35S::PATC128122 轉植株，在不同磷肥供應條件下的地上部與地下部無機磷含量

Table 5.8. Shoot and root Pi content of the 11-d-old *Arabidopsis thaliana* wild type and 35S::PATC128122 transgenic lines grown under various Pi supply conditions (250, 50 or 10  $\mu\text{M}$  ).

| Plants<br>(Wild type and<br>35S::PATC128122<br>lines) | Shoot Pi content (nmole)                   |       |       | Root Pi content (nmole)       |         |         |
|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-------|-------|-------------------------------|---------|---------|
|                                                       | P treatment ( $\mu\text{M}$ ) <sup>z</sup> |       |       | P treatment ( $\mu\text{M}$ ) |         |         |
|                                                       | 250                                        | 50    | 10    | 250                           | 50      | 10      |
| Wild type                                             | 54.7cd <sup>z</sup>                        | 19.7a | 4.5ab | 8.5b                          | 6.3a    | 3.4abc  |
| 1                                                     | 67.1a                                      | 24.0a | 5.0ab | 8.3b                          | 5.2bcd  | 3.2abcd |
| 2                                                     | 56.7bcd                                    | 25.0a | 4.3ab | 8.8b                          | 5.9ab   | 3.3abcd |
| 3                                                     | 59.1abc                                    | 26.9a | 5.1ab | 9.1b                          | 5.0cd   | 3.7a    |
| 4                                                     | 55.1bcd                                    | 25.0a | 5.1ab | 9.1b                          | 5.5abcd | 3.2abcd |
| 5                                                     | 58.8bc                                     | 28.3a | 5.5ab | 9.0b                          | 4.8d    | 3.0cd   |
| 7                                                     | 59.1abc                                    | 23.6a | 4.2ab | 10.9a                         | 5.5abcd | 3.6ab   |
| 8                                                     | 52.9cd                                     | 25.3a | 5.8a  | 7.9b                          | 5.6abc  | 2.8d    |
| 10                                                    | 48.4d                                      | 20.3a | 4.9ab | 8.6b                          | 5.1bcd  | 2.8cd   |
| 16                                                    | 63.1ab                                     | 23.5a | 3.9b  | 11.2a                         | 5.1bcd  | 3.0bcd  |
| Significance <sup>x</sup>                             | **                                         | NS    | NS    | **                            | *       | NS      |

<sup>z</sup> The 5-d-old seedlings were transferred to new agar plates containing 250, 50, or 10  $\mu\text{M}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$  for additional 6 days.

<sup>y</sup> Means followed by a different letter in columns represent significant differences at  $P \leq 0.05$  by LSD test.

<sup>x</sup> NS indicates no significant difference within columns. \* and \*\* indicate significant differences according to ANOVA test at  $P \leq 0.05$ , and  $P \leq 0.01$ , respectively; n = 3.

表 5.9. 20 天大的阿拉伯芥野生株與 35S::PATC128122 轉植株，在不同磷肥供應條件下的地上部與地下部鮮重、無機磷濃度與含量

Table 5.9. Shoot and root fresh weight, Pi concentration and content of the 20-d-old *Arabidopsis thaliana* wild type and 35S::PATC128122 transgenic lines grown under various Pi supply conditions (250, 50 or 10  $\mu$ M ).

| Plants<br>(Wild type and<br>35S::PATC128122<br>lines) | Shoot                               |       |         | Root                   |        |        |
|-------------------------------------------------------|-------------------------------------|-------|---------|------------------------|--------|--------|
|                                                       | P treatment ( $\mu$ M) <sup>z</sup> |       |         | P treatment ( $\mu$ M) |        |        |
|                                                       | 250                                 | 50    | 10      | 250                    | 50     | 10     |
| Fresh weight (mg)                                     |                                     |       |         |                        |        |        |
| Wild type                                             | 69.9bc <sup>y</sup>                 | 76.6a | 63.8abc | 24.7c                  | 28.6a  | 20.3bc |
| 1                                                     | 71.6bc                              | 67.2a | 50.4c   | 23.8c                  | 21.4b  | 17.2c  |
| 2                                                     | 71.1bc                              | 71.4a | 73.9ab  | 27.3bc                 | 24.5ab | 26.2ab |
| 4                                                     | 66.1c                               | 78.9a | 60.9bc  | 24.7c                  | 28.7a  | 20.4bc |
| 5                                                     | 79.7b                               | 68.7a | 77.5a   | 32.6ab                 | 24.4ab | 32.7a  |
| 7                                                     | 94.0a                               | 75.7a | 71.3ab  | 36.2a                  | 25.4ab | 30.8a  |
| Significance <sup>x</sup>                             | ***                                 | NS    | **      | **                     | NS     | ***    |
| Pi concentration (nmole /mg FW)                       |                                     |       |         |                        |        |        |
| Wild type                                             | 12.6ab                              | 11.6a | 6.2bc   | 7.6a                   | 6.9a   | 2.5ab  |
| 1                                                     | 13.1a                               | 12.7a | 8.2a    | 7.2a                   | 6.8a   | 2.3bc  |
| 2                                                     | 12.5ab                              | 12.3a | 5.9bc   | 7.2a                   | 7.0a   | 2.4ab  |
| 4                                                     | 11.5c                               | 11.7a | 6.6b    | 7.8a                   | 7.0a   | 3.1a   |
| 5                                                     | 11.8bc                              | 11.8a | 4.3d    | 7.2a                   | 6.7ab  | 1.4c   |
| 7                                                     | 11.0c                               | 10.4b | 4.9cd   | 7.2a                   | 6.4b   | 1.9bc  |
| Significance <sup>x</sup>                             | ***                                 | *     | ***     | NS                     | NS     | *      |
| Pi content (nmole)                                    |                                     |       |         |                        |        |        |
| Wild type                                             | 879bc                               | 896a  | 397a    | 186c                   | 198ab  | 51ab   |
| 1                                                     | 937ab                               | 850a  | 413a    | 172c                   | 145c   | 39b    |
| 2                                                     | 891bc                               | 870a  | 426a    | 194bc                  | 172abc | 63a    |
| 4                                                     | 760c                                | 916a  | 398a    | 191c                   | 202a   | 64a    |
| 5                                                     | 943ab                               | 809a  | 333a    | 238ab                  | 165bc  | 46ab   |
| 7                                                     | 1037a                               | 787a  | 349a    | 259a                   | 162bc  | 56ab   |
| Significance <sup>x</sup>                             | *                                   | NS    | NS      | **                     | *      | NS     |

<sup>z</sup> The 9-d-old seedlings were transferred from plates to hydroponic culture containing 250 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> for 4 days, and then 250, 50, or 10  $\mu$ M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> for additional 7 days.

<sup>y</sup> Means followed by a different letter in columns represent significant differences at  $P \leq 0.05$  by LSD test.

<sup>x</sup> NS indicates no significant difference within columns. \*, \*\* and \*\*\* indicate significant differences according to ANOVA test at  $P \leq 0.05$ , 0.01 or 0.001, respectively; n = 3.

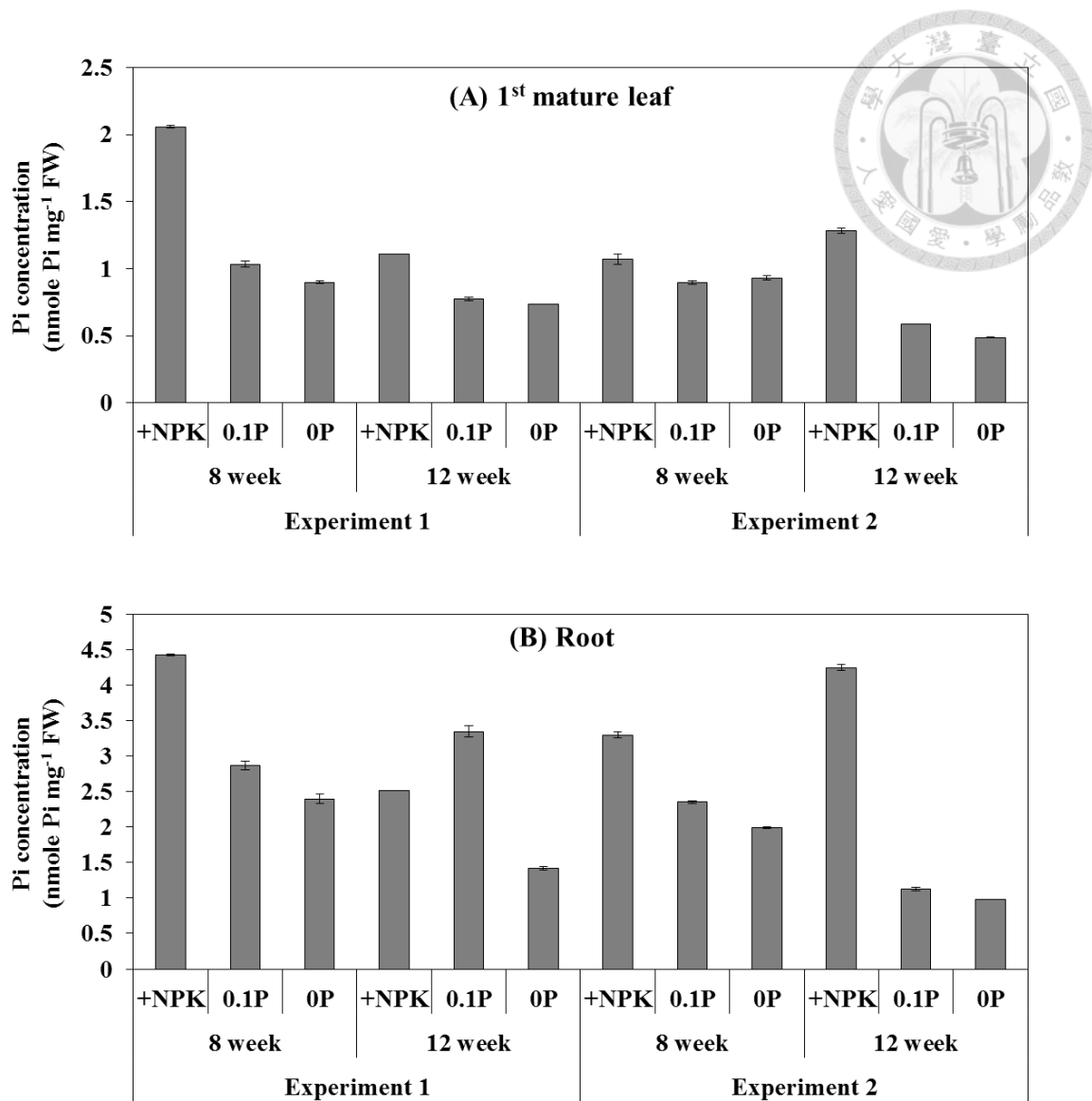


圖 5.1. 蝴蝶蘭的葉片(A)及根部(B)於正常施肥或缺磷下處理 8、12 週後的無機磷濃度

Fig. 5.1. Pi concentrations of the 1<sup>st</sup> mature leaf (A) and root (B) of *Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3' grown under normal (+NPK) or phosphate deficient (0.1P and 0P) conditions for 8 and 12 weeks. There are 2 biological replicates, in which 3 plants were mixed as one replicate. Error bar indicates standard deviation (SD) for two technical repeats.

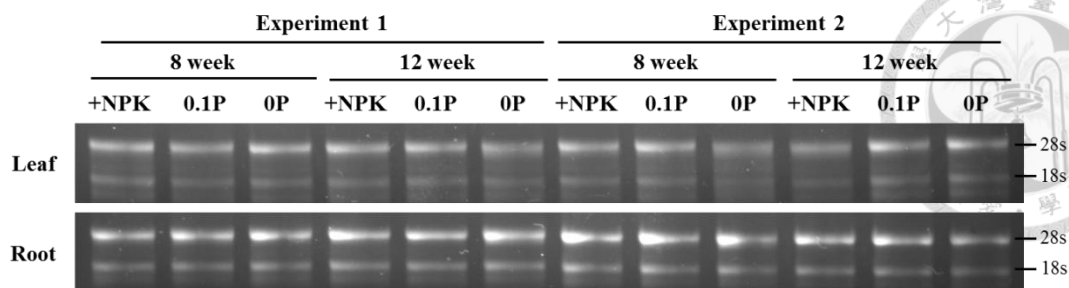


圖 5.2. 蝴蝶蘭的葉片及根部的 total RNA 品質

Fig. 5.2. Quality of total RNA isolated from the leaf and root of *Phalaenopsis Sogo Yukidian* 'V3'. Plants were grown under normal (+NPK) or phosphate deficient (0.1P and 0P) conditions for 8 and 12 weeks. There are 2 biological replicates, in which 3 plants were mixed as one replicate. Each lane contained 500 ng of total RNA and samples were separated by 1% agarose gel.

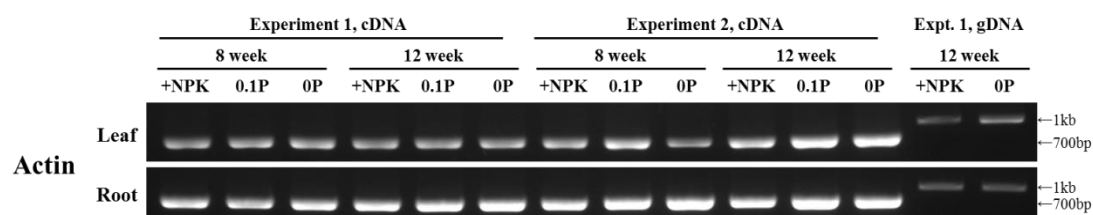


圖 5.3. 以跨越內含子之引子擴增蝴蝶蘭葉片及根部之 cDNA 及 gDNA 的肌動蛋白基因片段。mRNA 合成 cDNA 前皆經過去氧核糖核酸酶處理，對照組為蝴蝶蘭葉片與根部的 gDNA

Fig. 5.3. RT-PCR analyses of the actin expression in leaf and root of *Phalaenopsis Sogo Yukidian* 'V3'. The primers across an intron were used for amplification. The mRNAs were subjected to DNAase treatment (TURBO DNA-free™ Kit) before synthesis of cDNA. The rightmost 2 lanes were *Phal.* genomic DNA from as controls.

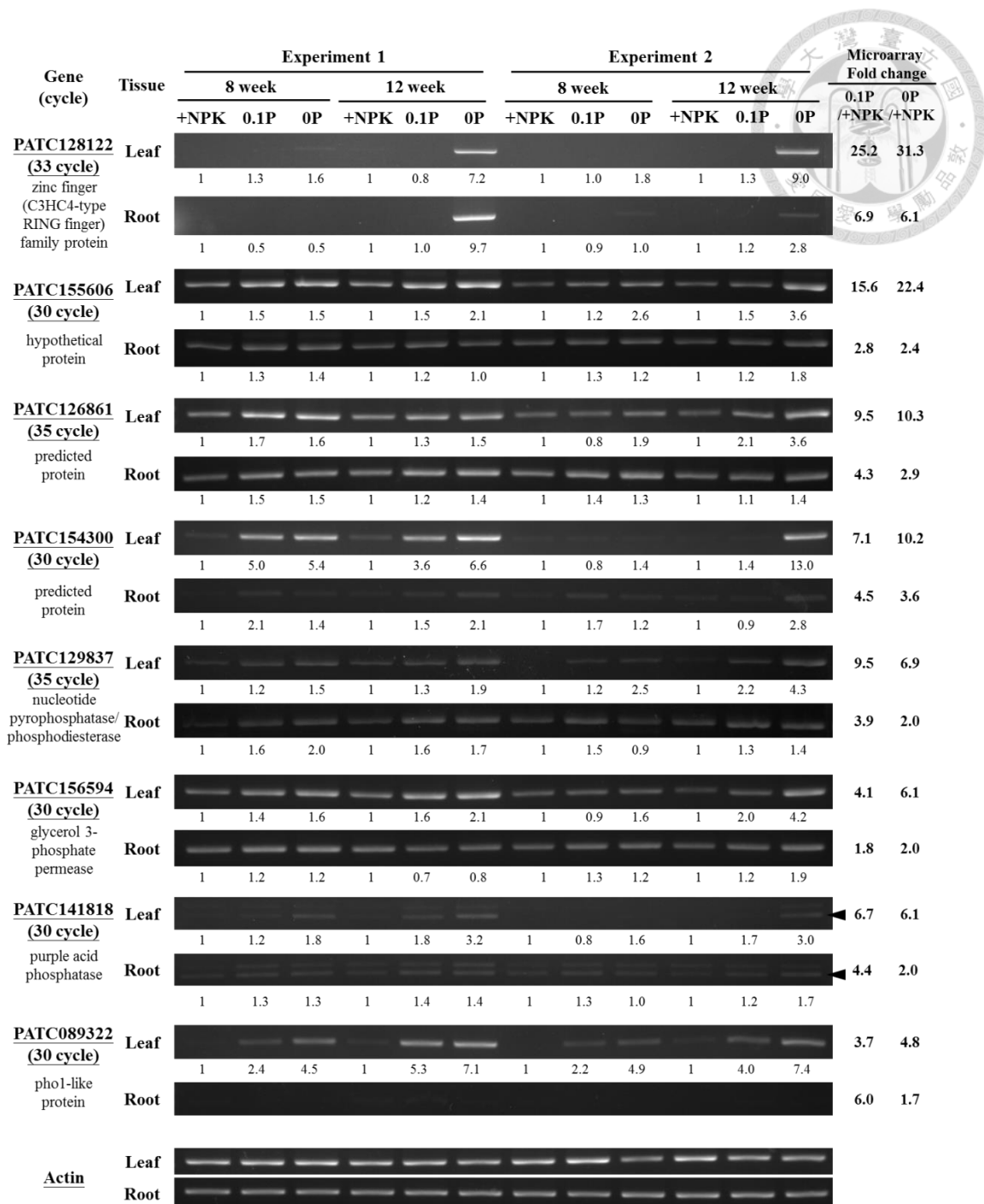


圖 5.4. 為了驗證微矩陣結果，以 RT-PCR 分析蝴蝶蘭缺磷下其葉片中上調或下調的候選基因，樣本為本試驗中缺磷處理 8、12 週的葉片與根

Fig. 5.4. RT-PCR analysis of the expression of selected genes (Table 5.1). Actin was used as a control to normalize the amounts of cDNA template. The numbers under bands were the expression level relative to +NPK [(treatment/actin) / (+NPK/actin)].



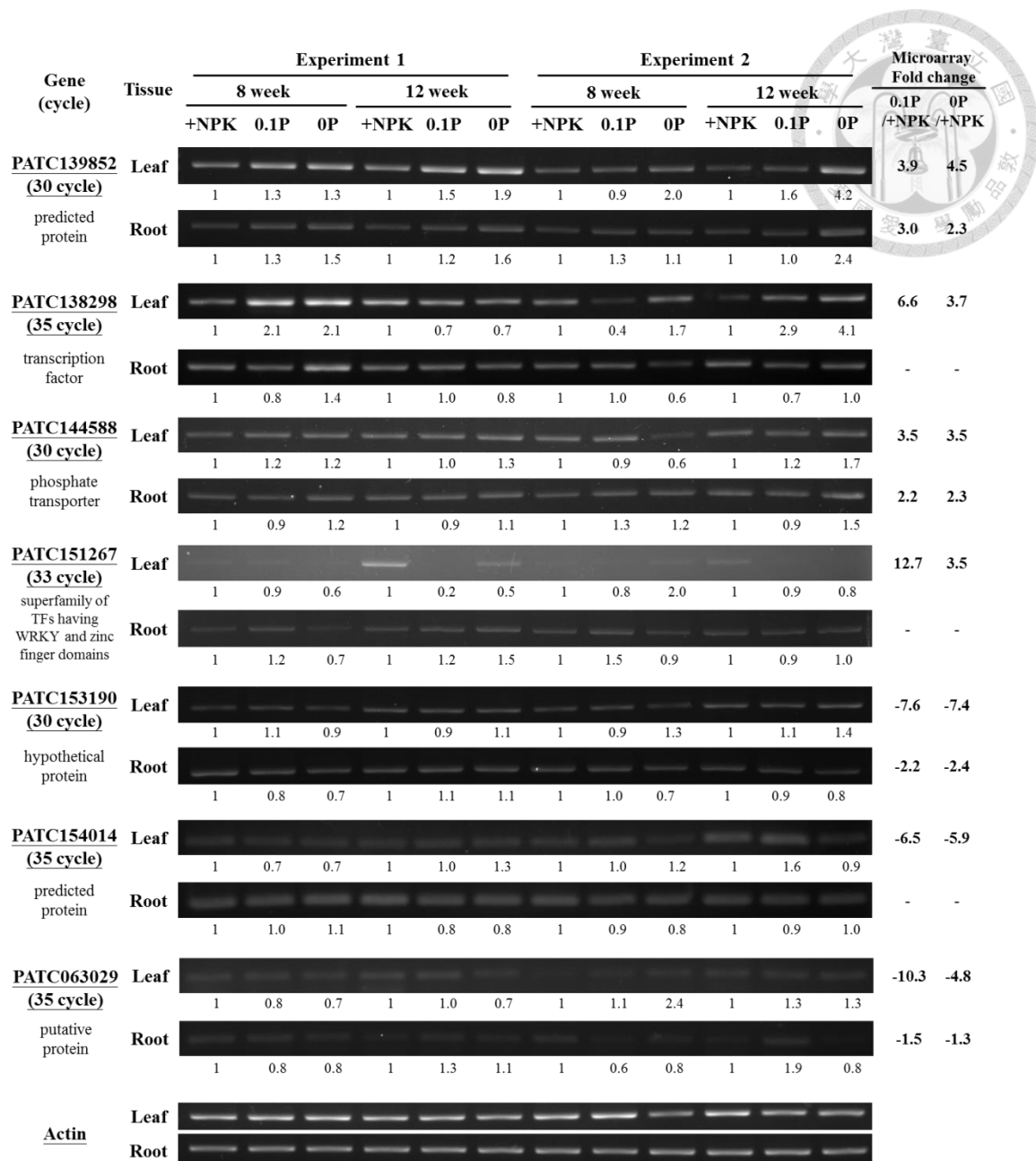


圖 5.4. (續) 為了驗證微矩陣結果，以 RT-PCR 分析蝴蝶蘭缺磷下其葉片中上調或下調的候選基因，樣本為本試驗中缺磷處理 8、12 週的葉片與根

Fig. 5.4. (Continued) RT-PCR analysis of the expression of selected genes (Table 5.1). Actin was used as a control to normalize the amounts of cDNA template. The numbers under bands were the expression level relative to +NPK [(treatment/actin) / (+NPK/actin)].

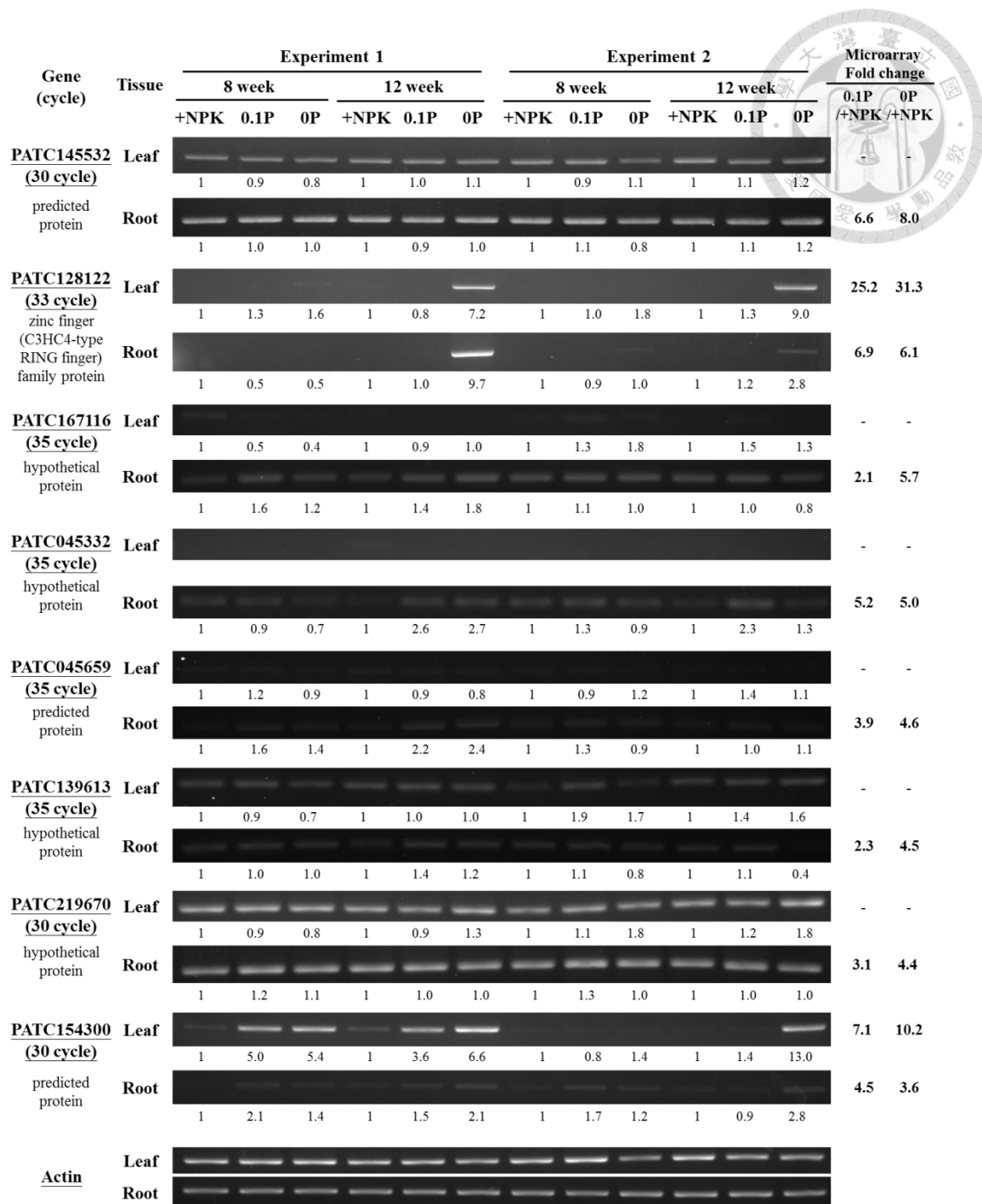


圖 5.5. 為了驗證微矩陣結果，以 RT-PCR 分析蝴蝶蘭缺磷下其根部中上調或下調的候選基因，樣本為本試驗中缺磷處理 8、12 週的葉片與根

Fig. 5.5. RT-PCR analysis of the expression of selected genes (Table 5.2). Actin was used as a control to normalize the amounts of cDNA template. The numbers under bands were the expression level relative to +NPK [(treatment/actin) / (+NPK/actin)].

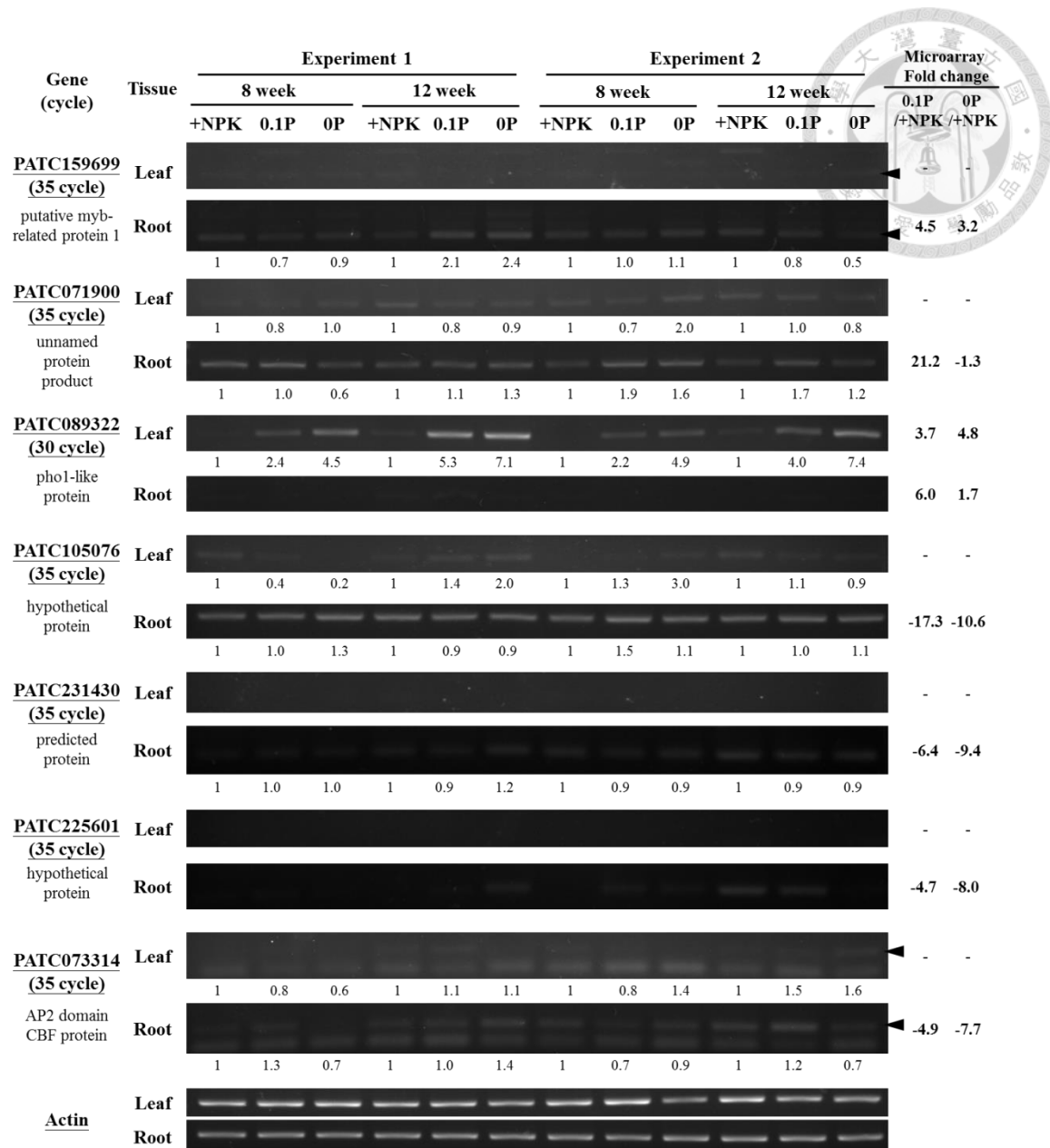


圖 5.5. (續) 為了驗證微矩陣結果，以 RT-PCR 分析蝴蝶蘭缺磷下其根部中上調或下調的候選基因，樣本為本試驗中缺磷處理 8、12 週的葉片與根

Fig. 5.5. (Continued) RT-PCR analysis of the expression of selected genes (Table 5.2). Actin was used as a control to normalize the amounts of cDNA template. The numbers under bands were the expression level relative to +NPK [(treatment/actin) / (+NPK/actin)].

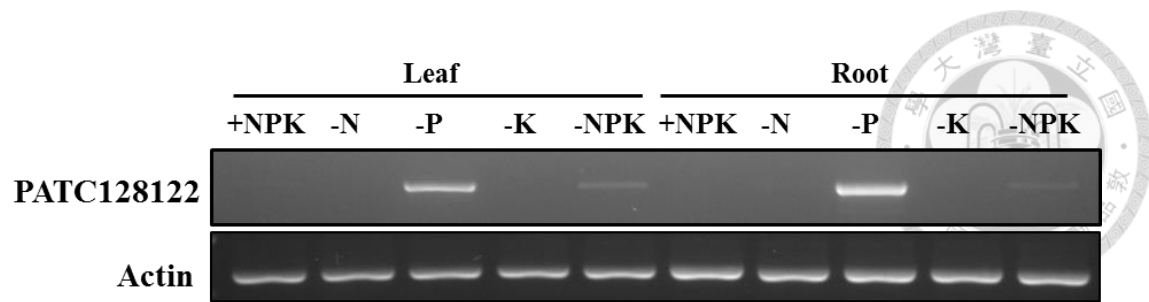
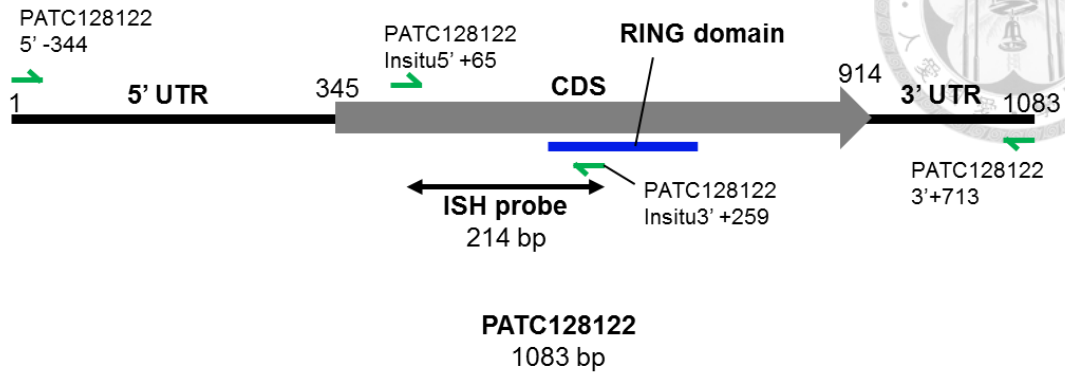


圖 5.6. 以 RT-PCR 分析基因 PATC128122 在蝴蝶蘭葉片與根部於不同礦物營養缺乏處理 12 週下的表現

Fig. 5.6. RT-PCR analysis of PATC128122 gene expression in the leaf and root of *Phal.* Sogo Yukidian 'V3' under different mineral nutrition deficiencies for 12 weeks. +NPK, normal condition. -N, nitrogen deficiency. -P, phosphorus deficiency. -K, potassium deficiency. Actin was used as a control to normalize the amounts of cDNA template.

(A)



(B)

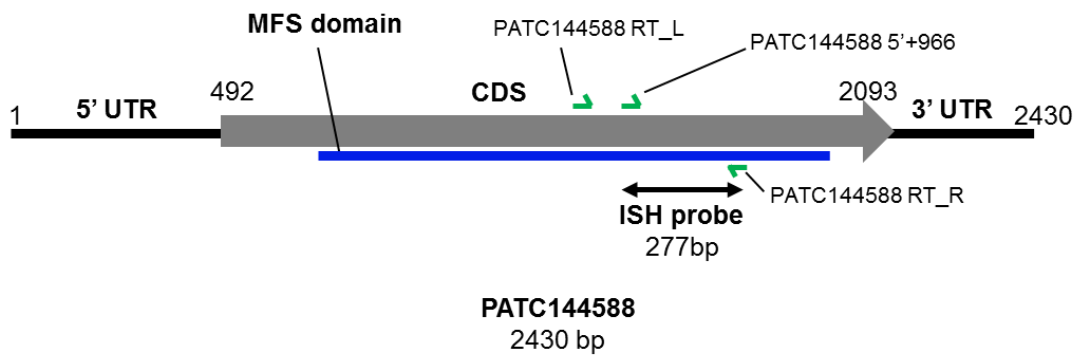


圖 5.7. PATC128122 基因(A)與 PATC144588 基因(B)之 mRNA 結構示意圖及原位雜交探針之位置

Fig. 5.7. The schematic diagram of mRNA and the location of probes used for in situ hybridization (ISH) in the genes of PATC128122 (A) and PATC144588(B), respectively. Black line, untranslated region. Gray arrow, coding sequence (CDS). Blue line, protein domain. Green arrow, primers for RT-PCR.

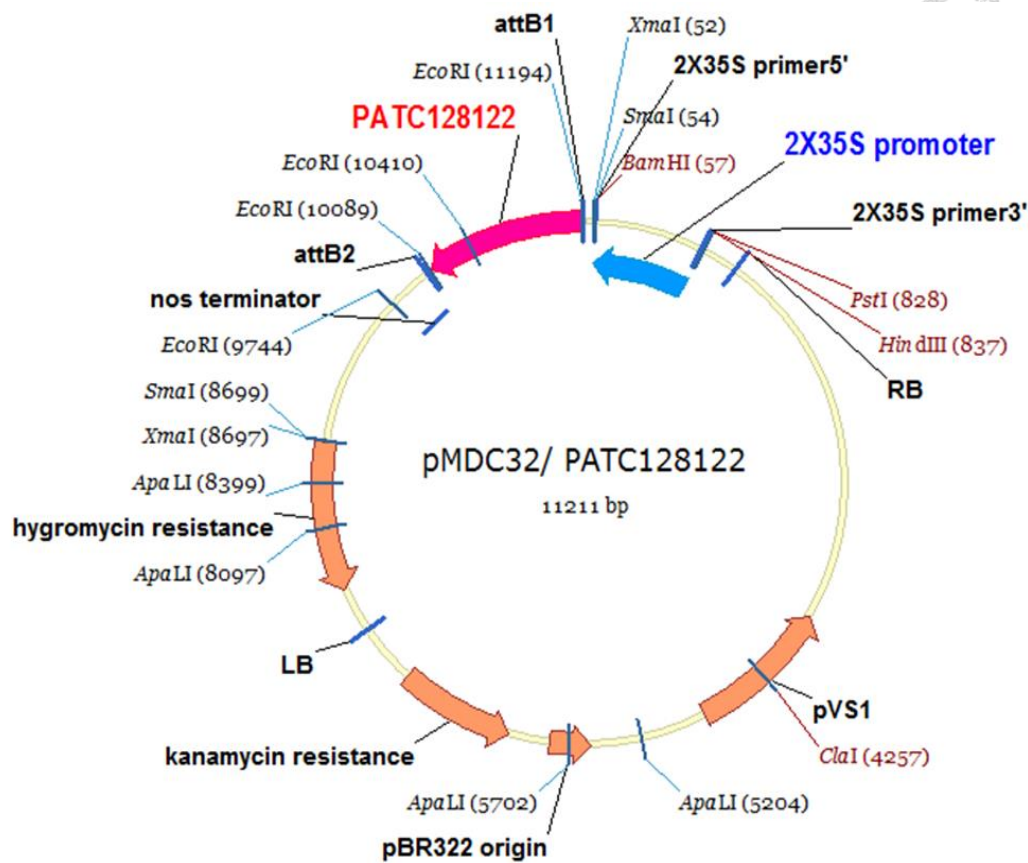


圖 5.8 表現載體 pMDC32 / PATC128122 之構築

Fig. 5.8. The construct for the expression of PATC12822 in the vector of pMDC32.

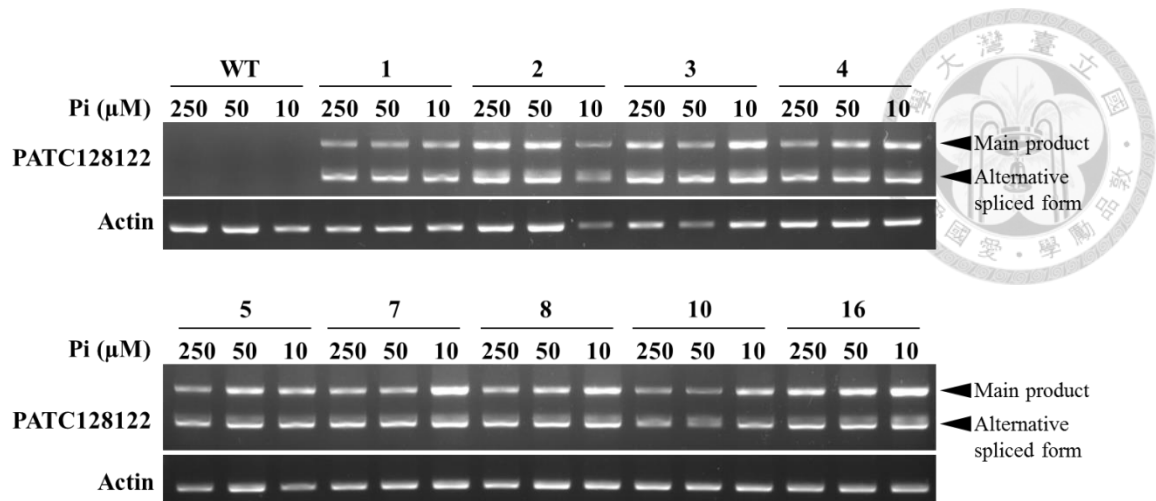
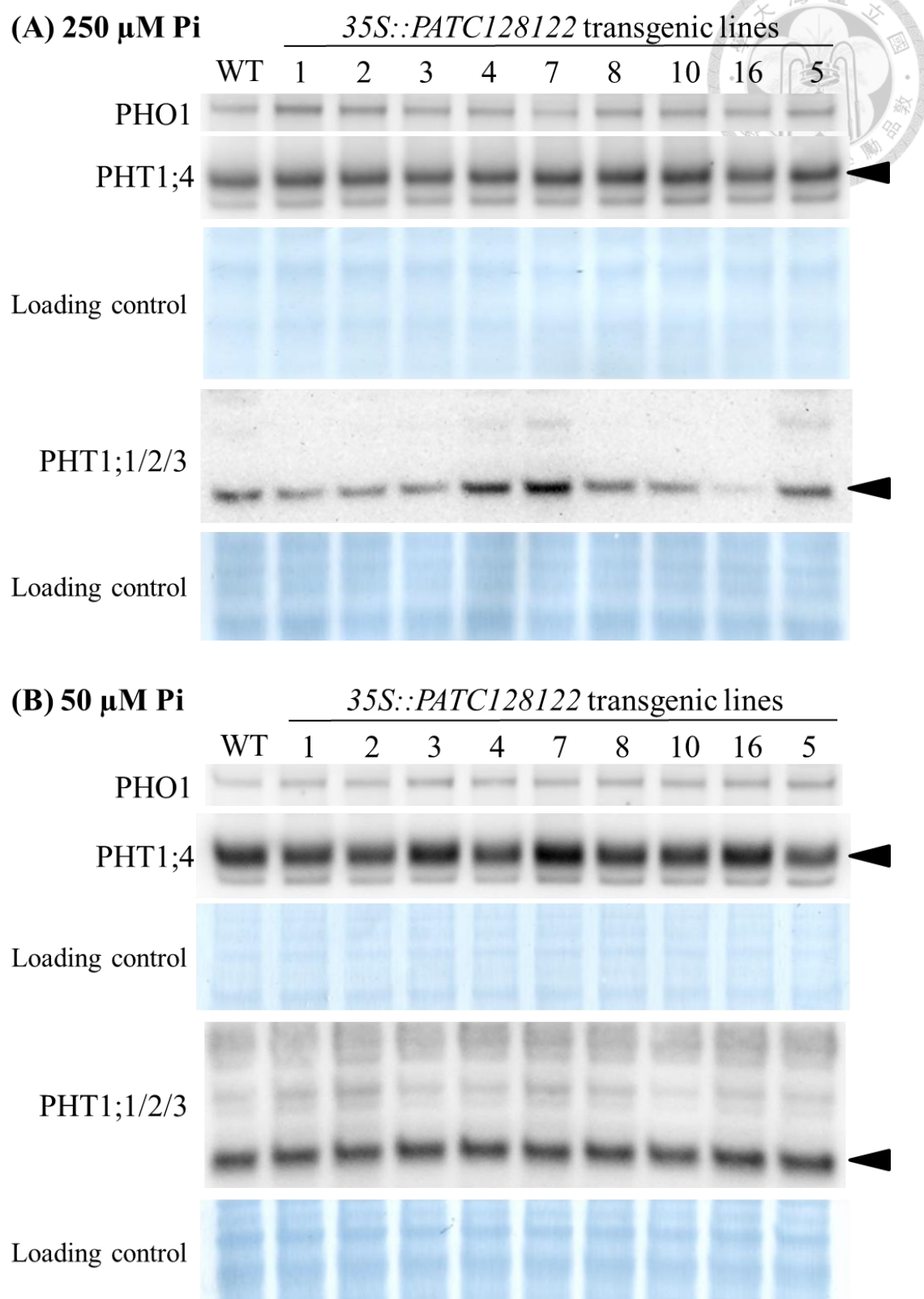


圖 5.9. 以 RT-PCR 分析基因 PATC128122 於 11 天大的阿拉伯芥野生株與 35S::PATC128122 轉植株的地上部中，在不同濃度的磷充足或缺乏條件下的表現

Fig. 5.9. RT-PCR analysis of PATC128122 gene expression in the shoot of the 11-d-old *Arabidopsis thaliana* wild type and 35S::PATC128122 transgenic lines under various Pi supply conditions (250, 50 or 10  $\mu\text{M}$ ). Actin was used as a control to normalize the amounts of cDNA template. WT, wild-type plants. 1-5, 7, 8, 10, 16 indicate the 35S::PATC128122 transgenic lines. The smaller size of amplified fragment is resulted from alternative splicing in transgenic plants.



(Continued)



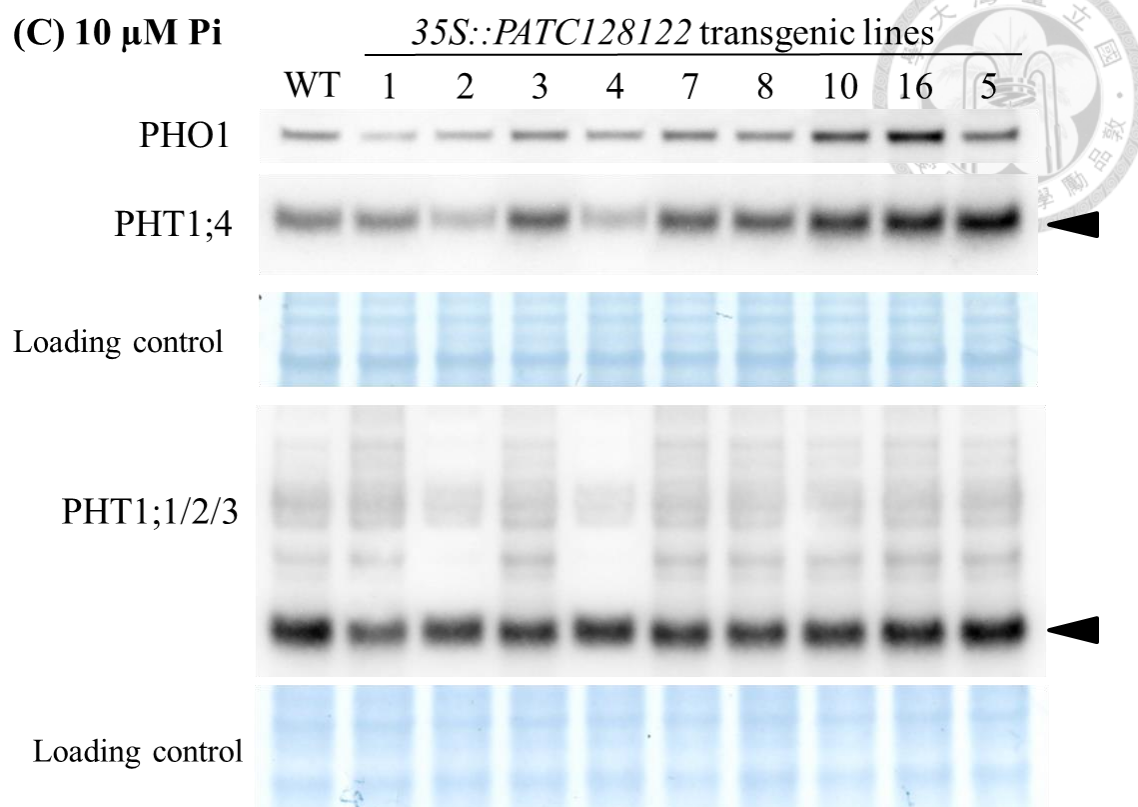


圖 5.10. 以西方墨點法分析蛋白質 PHO1、PHT1;4、PHT1;1/2/3 於 11 天大的阿拉伯芥野生株與 35S::*PATC128122* 轉植株的根部中，在 250  $\mu$ M (A)、50  $\mu$ M (B)、10  $\mu$ M (C) 不同濃度的磷處理下的表現

Fig. 5.10. Western blot analyses of PHO1, PHT1;4, PHT1;1/2/3 proteins in the root of 11-d-old *Arabidopsis thaliana* wild type and 35S::*PATC128122* transgenic lines under 250  $\mu$ M (A), 50  $\mu$ M (B) and 10  $\mu$ M (C) of Pi supplies, respectively. The bottom panels show the total protein staining on the blots. WT, wild-type plants.

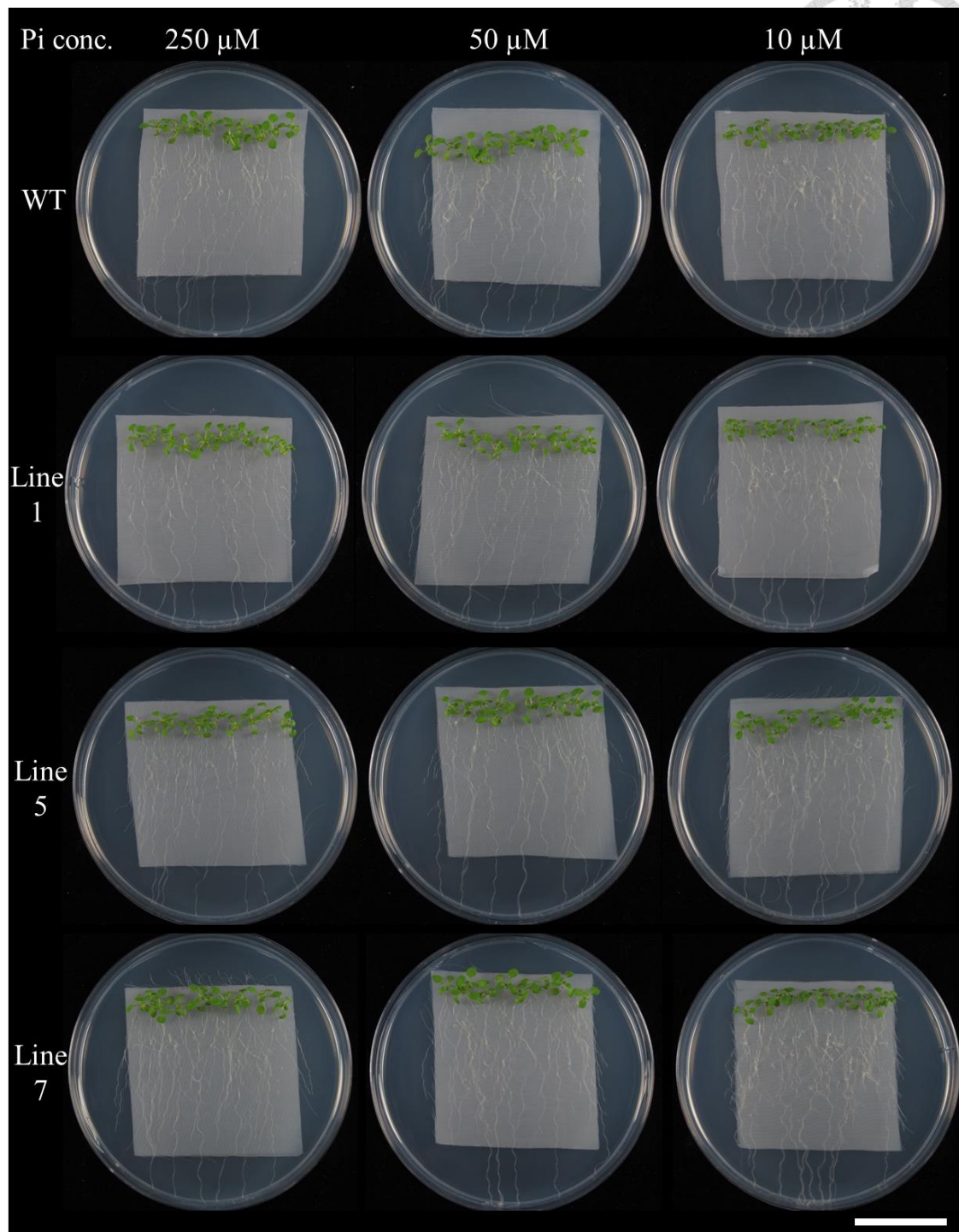


圖 5.11. 11 天大的阿拉伯芥野生株與 35S::PATC128122 轉植株(隨機挑選轉植株 1、5、7 品系呈現)在 250、50、10  $\mu\text{M}$  不同濃度的磷處理下的外觀形態

Fig. 5.11. The morphology of 11-d-old *Arabidopsis thaliana* wild-type (WT) and 35S::PATC128122 transgenic lines (lines 1, 5 and 7) grown under 250  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  or 10  $\mu\text{M}$  Pi supply. Bar = 3 cm.

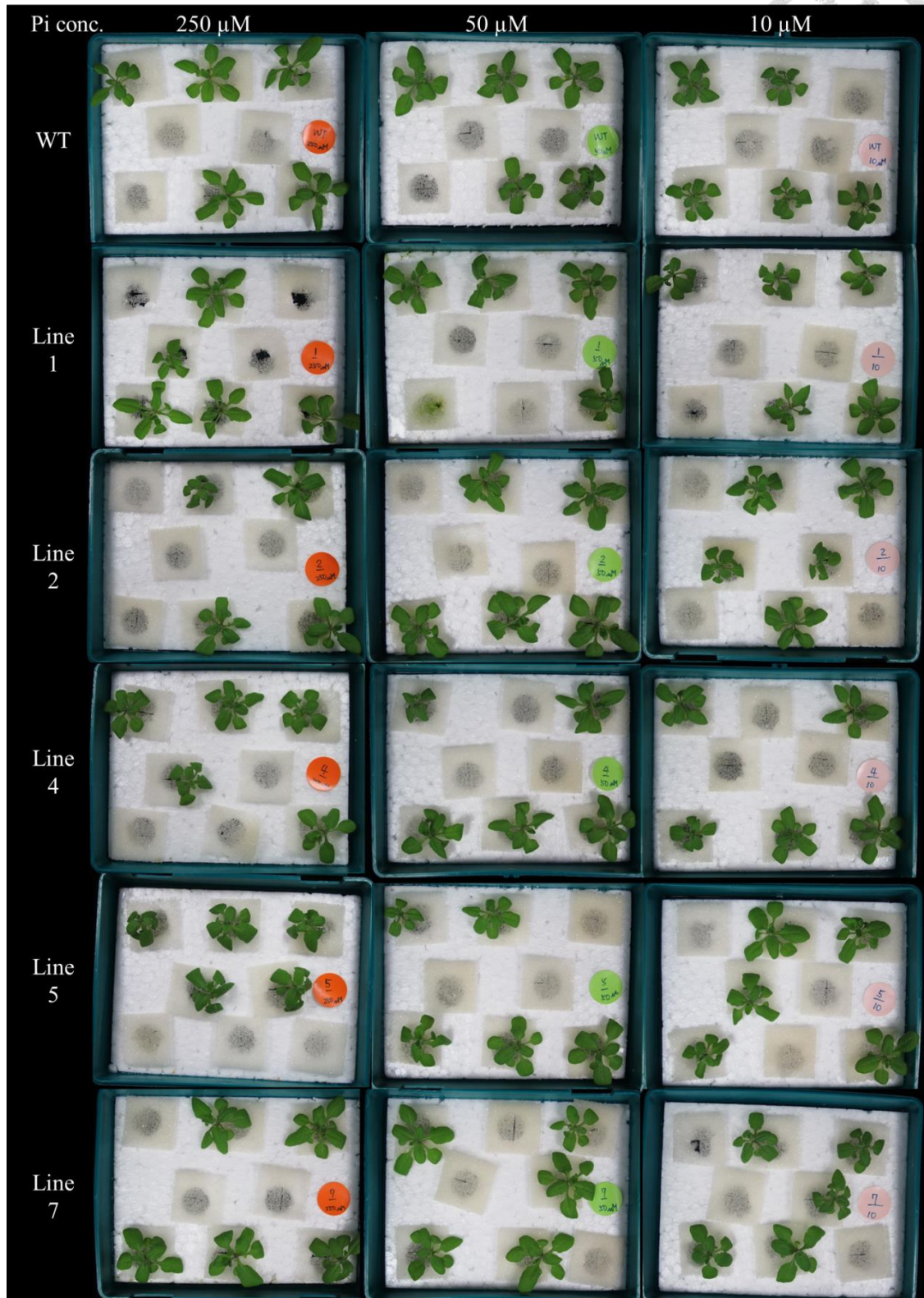


圖 5.12. 20 天大的阿拉伯芥野生株與 35S::PATC128122 轉植株於水耕培養下，在 250、50、10  $\mu\text{M}$  不同濃度的磷處理下的外觀形態

Fig. 5.12. The morphology of 20-d-old *Arabidopsis thaliana* wild-type (WT) and 35S::PATC128122 transgenic lines in hydroponic culture supplemented with 250  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  or 10  $\mu\text{M}$  Pi.



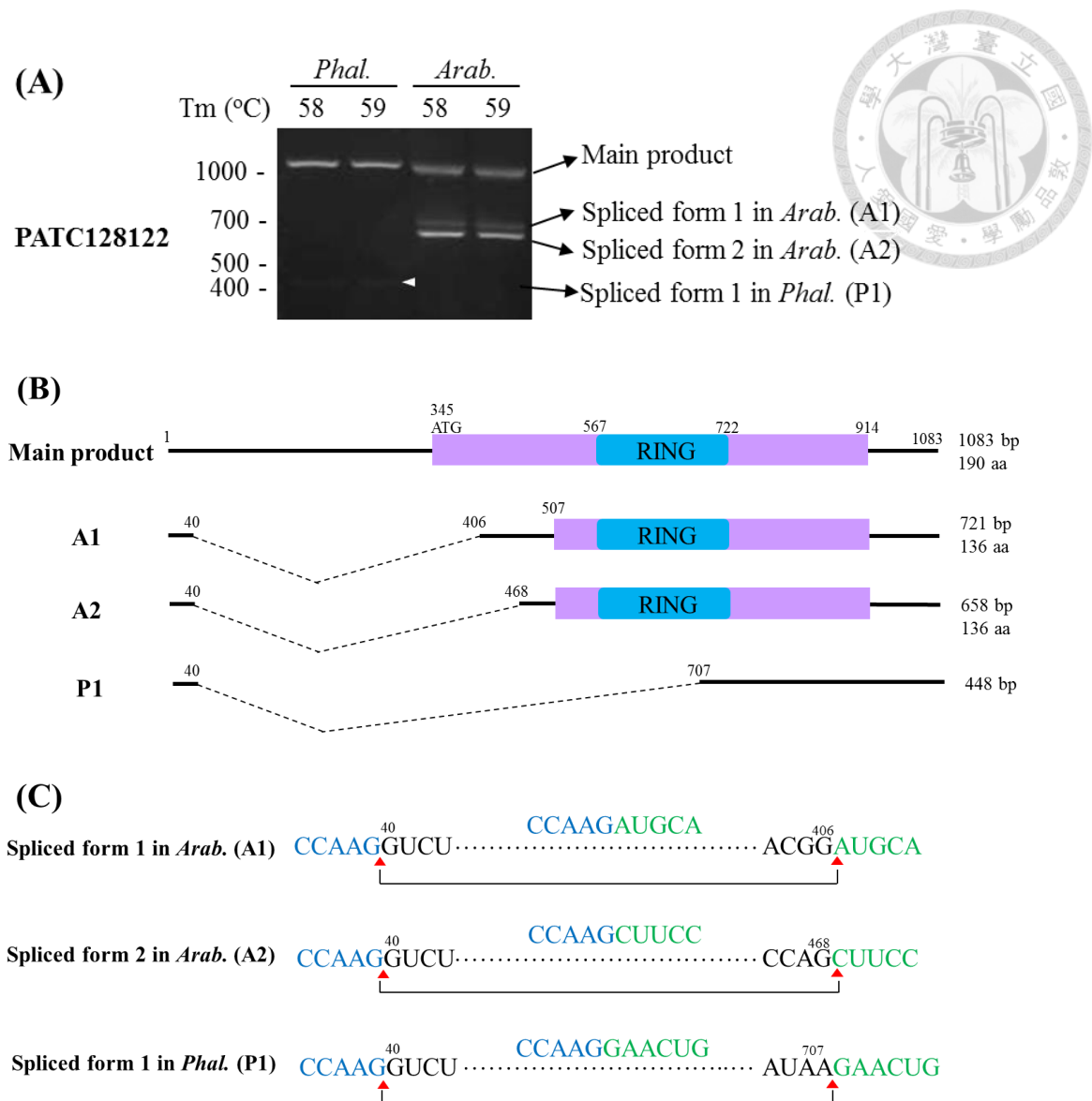


圖 5.13. 鑑定 PATC128122 在蝴蝶蘭與阿拉伯芥 35S::PATC128122 轉植株內的選擇性剪切形式

Fig. 5.13. Identification of alternative spliced variants of the gene PATC128122 from *Phalenopsis Sogo Yukidian* 'V3' and *Arabidopsis thaliana* 35S::PATC128122 transgenic plants. (A) Specific expression patterns of PATC128122 mRNA were confirmed by RT-PCR analysis. There are 2 spliced forms (A1 and A2) in *Arabidopsis* 35S::PATC128122 transgenic plants and 1 spliced form (P1) in phosphorus deficient *Phalenopsis Sogo Yukidian* 'V3'. (B) Schematic structures of mRNA spliced variants. Black lines, mRNA full length. Purple rectangles, potential coding sequence (CDS). Blue rectangles, RING finger domain. Total size of mRNA (bp) and potential protein (aa) are given on the right. (C) The nucleotide sequences of upstream and downstream exons are shown in blue and green, respectively and the introns are shown in black. Red triangles indicate the predicted splicing sites.

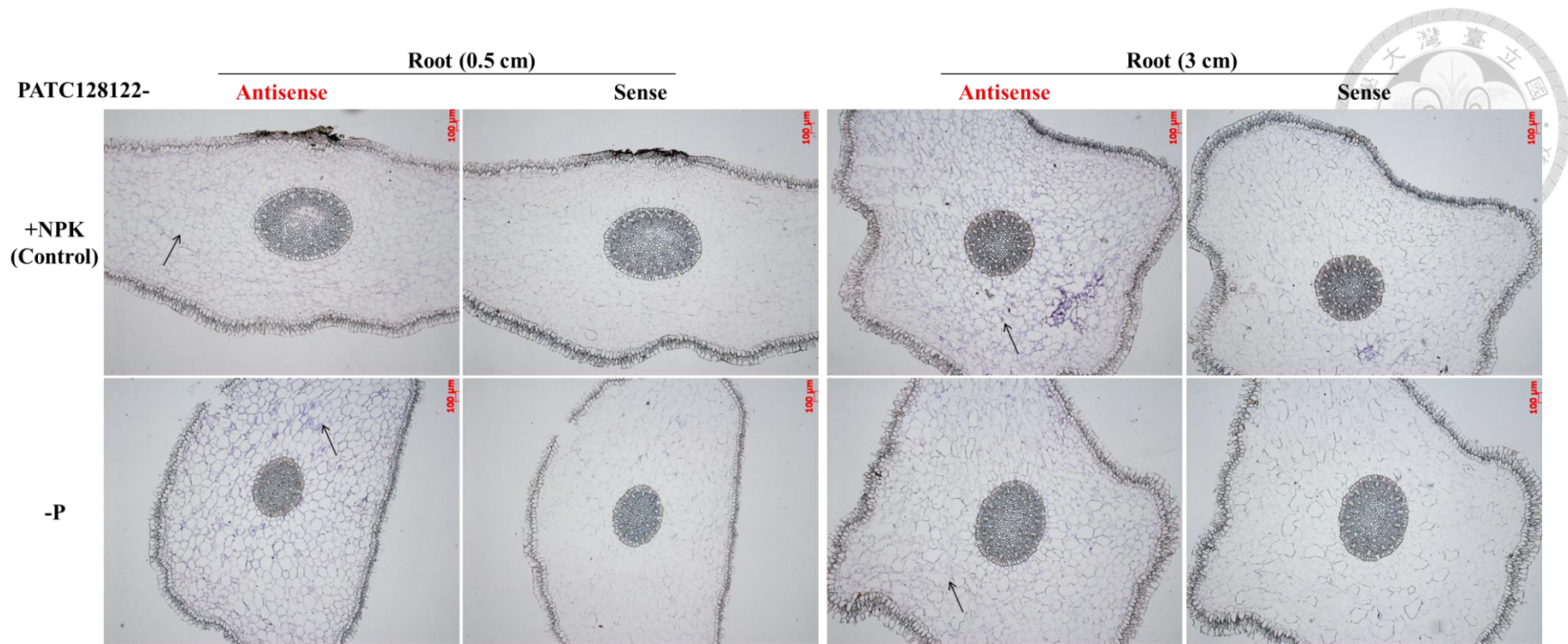


圖 5.14. 以原位雜交偵測 PATC128122 在蝴蝶蘭 *Phalaenopsis Sogo Yukidian* 'V3' 根部的表現位置

Fig. 5.14. In situ hybridization analyses of PATC128122 expression in the roots of *Phalaenopsis Sogo Yukidian* 'V3'. Plants were grown under normal (+NPK) or phosphate deficient (-P) conditions for 21 weeks. In situ hybridization with PATC128122 antisense probe was performed on cross sections of the root 0.5 or 3 cm away from the root tip. Sense probe was used as a negative control. Signals were detected in root cortex (arrow). Bar = 100 µm.

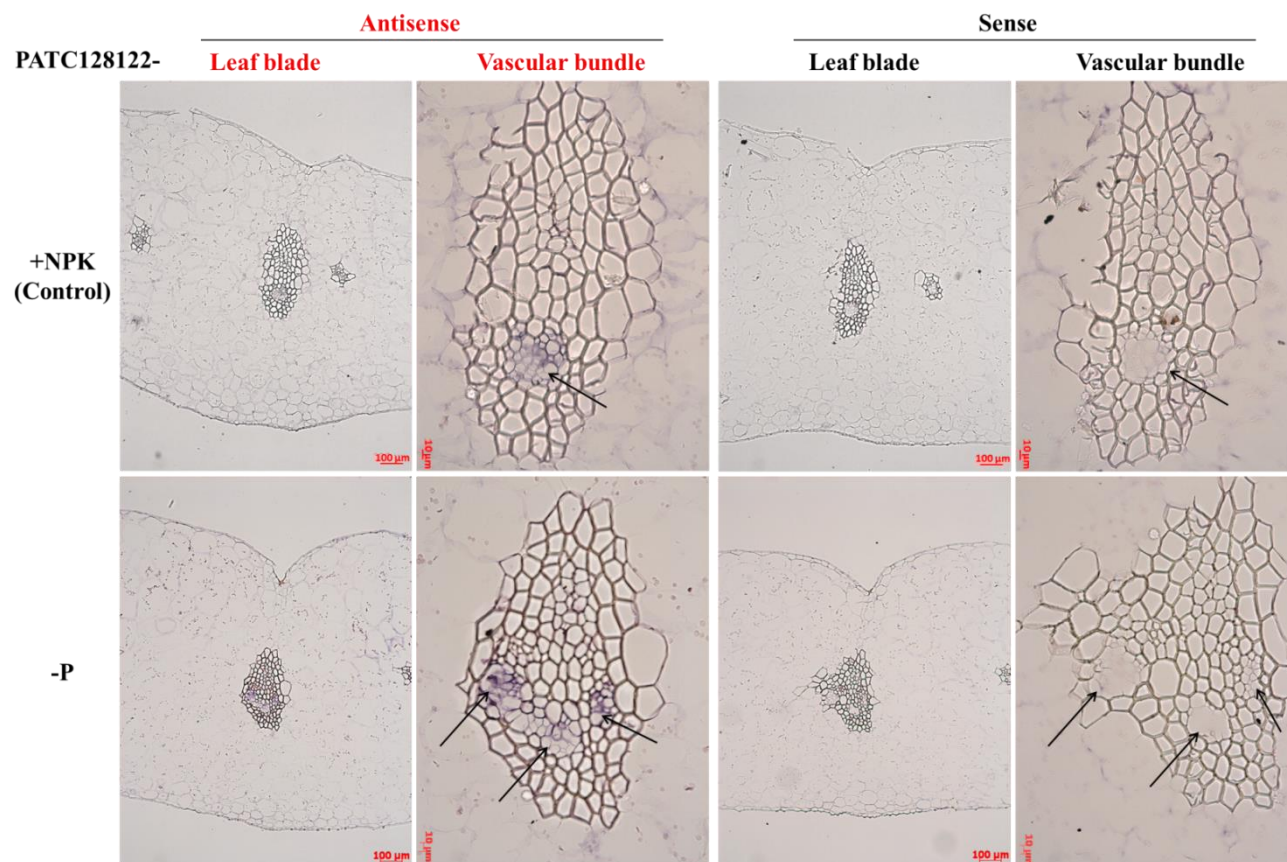


圖 5.15. 以原位雜交偵測 PATC128122 在蝴蝶蘭 *Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3' 葉片的表現位置

Fig. 5.15. In situ hybridization analyses of PATC128122 expression in the leaves of *Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3'. Plants were grown under normal (+NPK) or phosphate deficient (-P) conditions for 21 weeks. In situ hybridization was performed using PATC128122 antisense probe on cross sections of midrib in the 1st mature leaf. Sense probe was used as a negative control. Signals were detected in midrib phloem (arrow). Bar = 10 or 100  $\mu\text{m}$ .



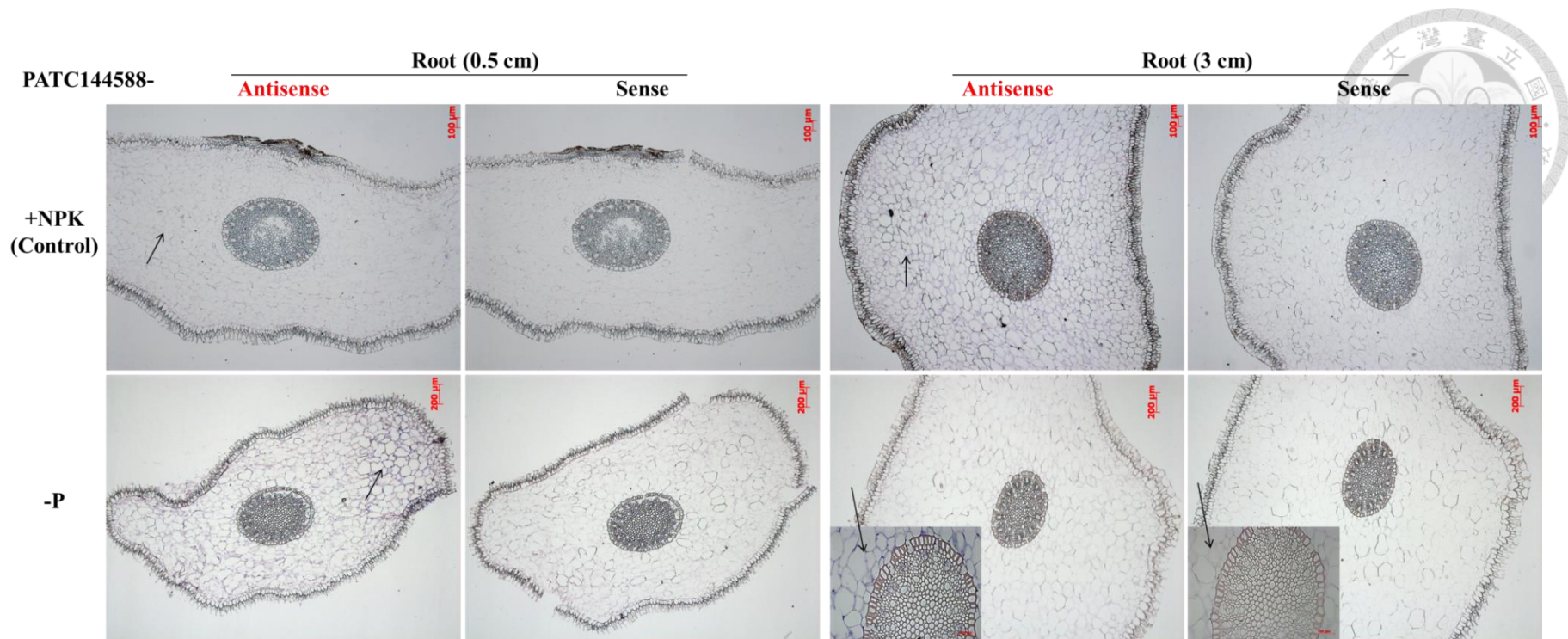


圖 5.16. 以原位雜交偵測 PATC144588 在蝴蝶蘭 *Phalaenopsis Sogo Yukidian* ‘V3’根部的表現位置

Fig. 5.16. In situ hybridization analyses of PATC144588 expression in the roots of *Phalaenopsis Sogo Yukidian* ‘V3’. Plants were grown under normal (+NPK) or phosphate deficient (-P) conditions for 21 weeks. In situ hybridization with PATC144588 antisense probe was performed on cross sections of the root 0.5 or 3 cm away from the root tip. Sense probe was used as a negative control. Signals were detected in root cortex (arrow). Bar = 100 or 200  $\mu$ m.

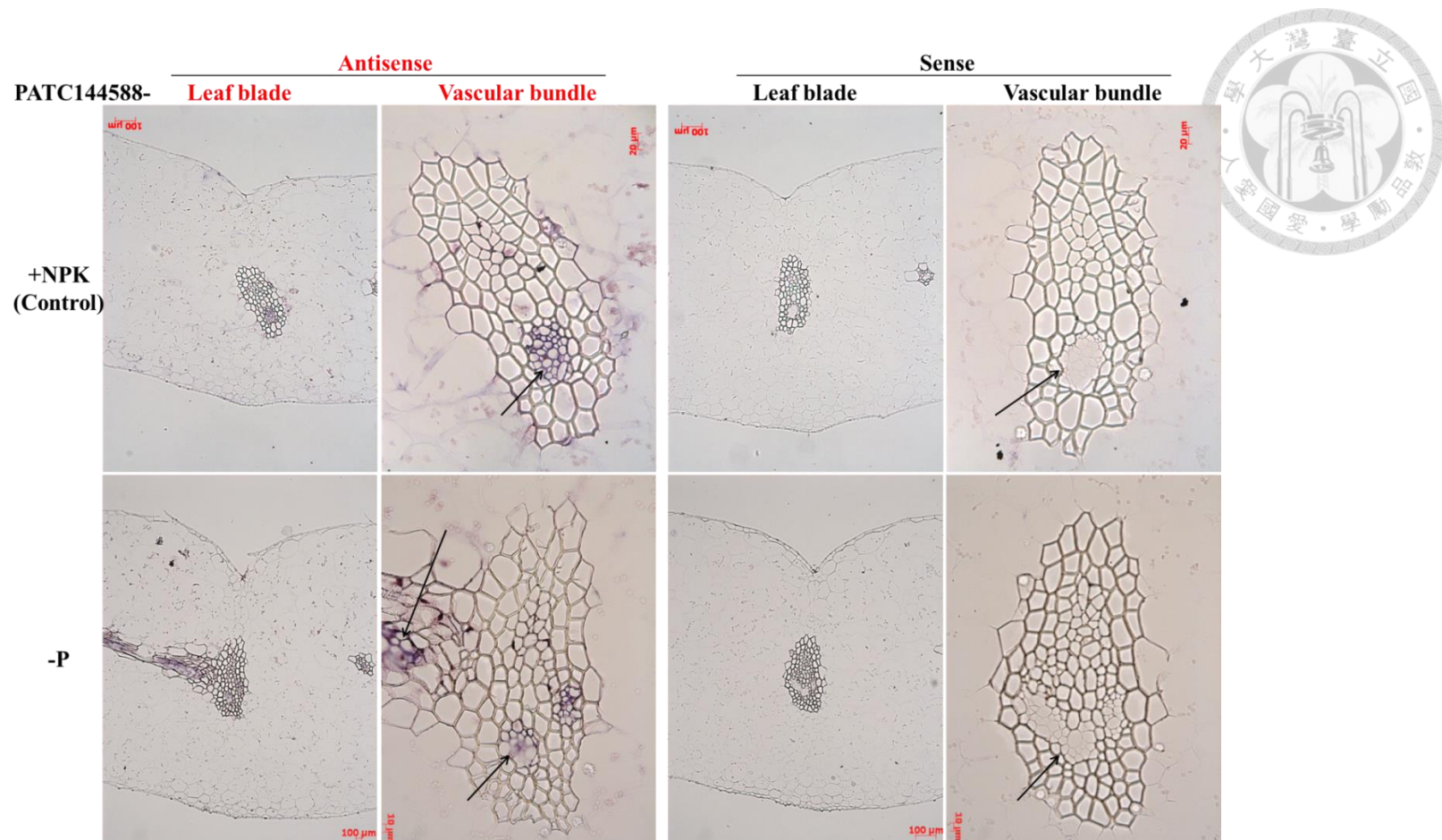


圖 5.17. 以原位雜交偵測 PATC144588 在蝴蝶蘭 *Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3' 葉片的表現位置

Fig. 5.17. In situ hybridization analyses of PATC144588 expression in the leaves of *Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3'. Plants were grown under normal (+NPK) or phosphate deficient (-P) conditions for 21 weeks. In situ hybridization was performed using PATC144588 antisense probe on cross sections of midrib in the 1st mature leaf. Sense probe was used as a negative control. Signals were detected in midrib phloem (arrow). Bar = 10 or 100  $\mu\text{m}$ .





## 第六章 結論

根據《第三章 蝴蝶蘭於養分逆境下的生長反應》的試驗結果得知，蝴蝶蘭對於缺氮、缺磷及缺鉀逆境具有高的耐受性。在缺肥處理 8 週以前，蝴蝶蘭的外觀與生理參數包括葉長、葉面積、鮮重與乾重、光合作用能力皆不受缺氮、缺磷或缺鉀處理影響，僅同時缺乏三大元素之處理(-NPK)的葉片生長與重量稍微下降；當缺肥處理 12 週後，缺磷植株的第一片成熟葉的葉片長度與面積、植株鮮重與乾重皆不受影響，與對照組沒有差異，另外，即使缺氮已經可以由葉綠素計讀值監測到 SPAD 值下降，但在外觀上無法用肉眼比較出缺氮、缺磷或缺鉀 12 週對植株的影響，植株健壯、且葉色濃綠。由此結果顯示蝴蝶蘭可以耐受長達 3 個月的缺肥，不易由外觀看出徵狀。

將蝴蝶蘭分別置於不同溫度下而維持營養生長或促使轉為生殖生長，同樣地處理缺氮、缺磷或缺鉀 32 週，經低溫誘導開花的植株其缺肥徵狀較明顯，顯示花梗與花朵為生殖生長期間的強積儲，會消耗大量養分而造成植株生長量與開花表現受到影響。缺氮造成開花表現不佳，花朵減少、變小且花梗縮短，缺磷會抑制植株的抽梗現象，而缺鉀處理的植株在本試驗中，外觀與生理參數包括光合作用能力皆不受影響，僅抽梗時間延後。由以上結果顯示，蝴蝶蘭的開花過程需要充足的氮與磷，而本試驗的植株可能在處理前已貯存足夠的鉀，因此缺鉀徵狀不明顯。營養生長下的植株在長期的缺氮、缺磷、缺鉀逆境下 32 週後，缺氮與同時缺乏氮、磷、鉀(-NPK)處理的植株生長勢與鮮重明顯下降，外觀生長不良；缺磷雖然第一片成熟葉的生長不受影響，但有明顯的落葉現象；缺鉀的植株則沒有任何徵狀。綜合以上的生理調查結果顯示，蝴蝶蘭缺乏元素的徵狀發生情形很緩慢，其中必定有相關的生理機制使之能克服長期的缺肥逆境。

《第四章 蝴蝶蘭於缺磷下的形態解剖觀察》的試驗結果中，缺磷 22-23 週對

於蝴蝶蘭葉片與根部的細胞組織結構層面上改變不顯著，缺磷的葉片橫切面與對照組無差異，但是缺磷植株的根部中，中柱面積與維管束數目顯著少於對照組，並以距離根尖 1 公分之橫切面最顯著，推論缺磷可能造成根部的生長與發育受阻、減緩。

在《第五章 蝴蝶蘭於缺磷下的基因表現》的試驗中，嘗試以基因分子層面進一步找出受到缺磷誘導反應的基因。首先，以 RT-PCR 方法驗證微矩陣結果中的候選基因，結果顯示，目前只有在葉片中大量上調表現的基因可以被驗證，有 10 個候選基因在本試驗中可偵測到其受缺磷而誘導增加表現量，其中以蝴蝶蘭基因 PATC128122 表現量與對照組差異最大，且不受缺氮、缺鉀影響。因此現階段中，將 PATC128122 大量表現於阿拉伯芥中，嘗試探討此基因的功能，但是阿拉伯芥 35S::PATC128122 轉植株於缺磷條件下與野生株無差異，另外以 RNA 原位雜交方式偵測基因 PATC128122 於蝴蝶蘭葉片與根部中的表現位置，得知主要表現於葉片的韌皮部與根部的皮層上。

蝴蝶蘭基因 PATC128122 的蛋白質序列上具有一段 RING domain，可能與許多生理代謝的調控路徑相關，雖然目前仍不知道其功能性，但可確定此為蝴蝶蘭於缺磷逆境下會大量表現的代表基因。研究蝴蝶蘭的基因調控的研究與技術仍少，目前雖然大量表現 PATC128122 於阿拉伯芥中不能看出差異，但可利用其他方法再進行測試，例如以病毒誘導基因沉默(virus induced gene silencing, VIGS)技術等。未來可再挑選其他於缺磷下誘導反應的候選基因，例如 PATC154300、PATC155606 或其他具有功能性的轉運蛋白、轉錄因子，進一步地研究蝴蝶蘭面臨缺磷逆境的分子調控機制。

## 參考文獻



- 沈再木. 2007. 蝴蝶蘭栽培介質種類及物化特性. p. 19-28. 刊於：沈再木等編著. 蝴蝶蘭栽培. 國立嘉義大學. 嘉義.
- 宋芬玫. 1986. 台灣一葉蘭之生長與氮磷鉀對葉片生理之影響. 國立臺灣大學園藝暨景觀學系碩士論文. 臺北.
- 李嘉慧、李晔. 1991. 台灣蝴蝶蘭根和葉的形態與解剖的特性. 中國園藝 37:237-248.
- 林芳儀. 2004. 野生蘭花. p. 78-87. 刊於：李培芬等編著. 台灣的自然資源與生態資料庫-II 綠色大地. 行政院農業委員會林務局. 臺北.
- 林菁敏、李晔. 1988. 蝴蝶蘭葉面積之估算與溫度對葉片生長之影響. 中國園藝 134:73-80.
- 林瑞松、徐懷恩、賴淑芬. 1999. 硝酸態氮與銨態氮比例對文心蘭植物無機元素含量與開花之影響. 中國園藝 45:43-52.
- 洪丁楨. 2012. 蝴蝶蘭光合作用研究—生理試驗與生物晶片綜合分析. 國立臺灣大學園藝暨景觀學系碩士論文. 臺北.
- 侯德瑩. 2007. 磷肥對文心蘭之生長與切花品質的影響. 國立中興大學園藝學研究所碩士論文. 臺中.
- 郭宜靄. 文心蘭對氮之吸收與氮於植體內之分配. 國立臺灣大學園藝暨景觀學系碩士論文. 臺北.
- 郭毓良. 1984. 氮磷鉀施肥濃度及時期對台灣一葉蘭生長與開花的影響. 國立臺灣大學園藝暨景觀學系碩士論文. 臺北.
- 陳怡臻. 2014. 蝴蝶蘭瓶苗下位葉黃化之成因及組培苗於礦物營養缺乏下之徵狀. 國立臺灣大學園藝暨景觀學系碩士論文. 臺北.
- 陳澄如. 2001. 礦物營養對蝴蝶蘭生育、組織礦物成分及抽梗時葉片品質之影響. 國立臺灣大學園藝暨景觀學系碩士論文. 臺北.
- 許榮華. 2010. 假球莖於附生蘭生育上所扮演的角色. 臺中區農業改良場特刊 105:154-162.
- 張耀乾. 2007. 蝴蝶蘭的生育環境. p. 1-6. 刊於：沈再木等編著. 蝴蝶蘭栽培. 國立嘉義大學. 嘉義.
- 黃美惠. 1994. 蝴蝶蘭之花期調節、碳水化合物及礦物元素周年變化之研究. 國立中興大學園藝學研究所碩士論文. 臺中.
- 游雅琪. 2012. 蝴蝶蘭於氮、磷、鉀養分逆境下之生長反應與基因功能分析. 國立

臺灣大學園藝暨景觀學系碩士論文. 臺北.

彭穎君. 2008. 大白花蝴蝶蘭‘V3’對氮素之吸收、運移及利用. 國立臺灣大學園藝暨景觀學系碩士論文. 臺北.

彭穎君、鍾仁賜、何聖賓、張耀乾. 2010. 銨態與硝酸態氮比例影響大白花蝴蝶蘭營養與生殖生長. 臺灣園藝 56:45-56.

雷欣怡. 2007. 蝴蝶蘭開花期礦物元素組成變化與肥料需求. 國立臺灣大學園藝暨景觀學系碩士論文. 臺北.

蘇春霖、許仁弘、施明哲. 2011. 蝴蝶蘭基因資料庫建構歷程與展望. 植物種苗生技 25:59-63.

Abel, S. 2011. Phosphate sensing in root development. Curr. Opin. Plant Biol. 14:303-309.

Ames, B.N. 1966. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. Methods Enzymol. 8:115-118.

Atwood, J. 1986. The size of Orchidaceae and the systematic distribution of epiphytic orchids. Selbyana 9:171-186.

Bari, R., B.D. Pant, M. Stitt, and W.R. Scheible. 2006. PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. Plant Physiol. 141:988-999.

Bates, T.R. and J.P. Lynch. 1996. Stimulation of root hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorus availability. Plant Cell Environ. 19:529-538.

Bednarz, C.W., D.M. Oosterhuis, and R.D. Evans. 1998. Leaf photosynthesis and carbon isotope discrimination of cotton in response to potassium deficiency. Environ. Exp. Bot. 39:131-139.

Benzing, D.H. 1986. The vegetative basis of vascular epiphytism. Selbyana 9:23-43.

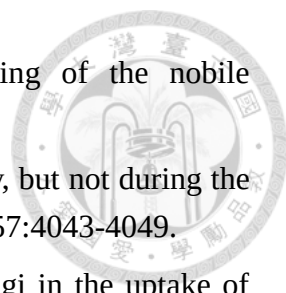
Benzing, D.H., W.E. Friedman, G. Peterson, and A. Renfrow. 1983. Shootlessness, velamentous roots, and the pre-eminence of orchidaceae in the epiphytic biotope. Amer. J. Bot. 70:121-133.

Benzing, D.H., D.W. Ott, and W.E. Friedman. 1982. Roots of *Sobralia macrantha* (orchidaceae): structure and function of the velamen-exodermis complex. Amer. J. Bot. 69:608-614.

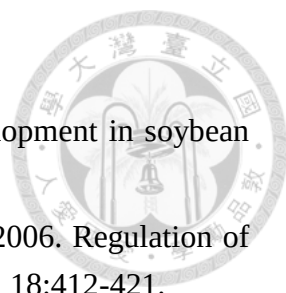
Bercu, R., A. Bavaru, and L. Broască. 2011. Anatomical aspects of *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume. Ann. Romanian Soc. Cell Biol. 16:102-109.

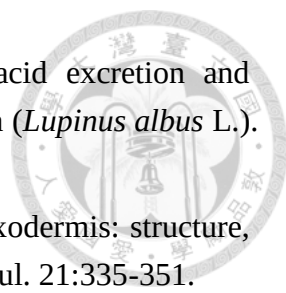
Bi, X., G.S. Khush, and J. Bennett. 2005. The rice nucellin gene ortholog OsAsp1 encodes an active aspartic protease without a plant-specific insert and is strongly expressed in early embryo. Plant Cell Physiol. 46:87-98.

Bichsel, R.G., T.W. Starman, and Y.T. Wang. 2008. Nitrogen, phosphorus, and

- 
- potassium requirements for optimizing growth and flowering of the nobile dendrobium as a potted orchid. *HortScience* 43:328-332.
- Blanchard, M.G. and E.S. Runkle. 2006. Temperature during the day, but not during the night, controls flowering of *Phalaenopsis* orchids. *J. Exp. Bot.* 57:4043-4049.
- Bolan, N.S. 1991. A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant Soil* 134:189-207.
- Bondada, B.R. and J.P. Syvertsen. 2005. Concurrent changes in net CO<sub>2</sub> assimilation and chloroplast ultrastructure in nitrogen deficient citrus leaves. *Environ. Exp. Bot.* 54:41-48.
- Brundrett, M., D. Enstone, and C. Peterson. 1988. A berberine-aniline blue fluorescent staining procedure for suberin, lignin, and callose in plant tissue. *Protoplasma* 146:133-142.
- Bustos, R., G. Castrillo, F. Linhares, M.I. Puga, V. Rubio, J. Pérez-Pérez, R. Solano, A. Leyva, and J. Paz-Ares. 2010. A central regulatory system largely controls transcriptional activation and repression responses to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* 6:e1001102.
- Cameron, D.D., I. Johnson, J.R. Leake, and D.J. Read. 2007. Mycorrhizal acquisition of inorganic phosphorus by the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *Ann. Bot.* 99:831-834.
- Cameron, D.D., J.R. Leake, and D.J. Read. 2006. Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant-fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *New Phytol.* 171:405-416.
- Chalker-Scott, L. 1999. Environmental Significance of Anthocyanins in Plant Stress Responses. *Photochemistry and Photobiology* 70:1-9.
- Chang, Y.Y., Y.W. Chu, C.W. Chen, W.M. Leu, H.F. Hsu, and C.H. Yang. 2011. Characterization of *Oncidium* ‘Gower Ramsey’ transcriptomes using 454 GS-FLX pyrosequencing and their application to the identification of genes associated with flowering Time. *Plant Cell Physiol.* 52:1532-1545.
- Chao, Y.T., C.L. Su, W.H. Jean, W.C. Chen, Y.C. Chang, and M.C. Shih. 2014. Identification and characterization of the microRNA transcriptome of a moth orchid *Phalaenopsis aphrodite*. *Plant Mol. Biol.* 84:529-548.
- Chen, Y.F., L.Q. Li, Q. Xu, Y.H. Kong, H. Wang, and W.H. Wu. 2009. The WRKY6 transcription factor modulates PHOSPHATE1 expression in response to low Pi stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21:3554-3566.
- Chiang, S.H.T. 1970. Development of the root of *Dendrobium kwashotense* Hay. with special reference to the cellular structure of its exodermis and velamen. *Taiwania*

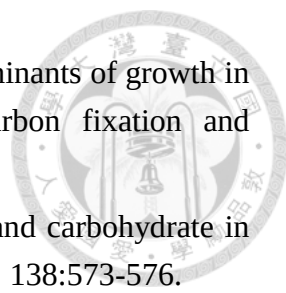
15:1-16.

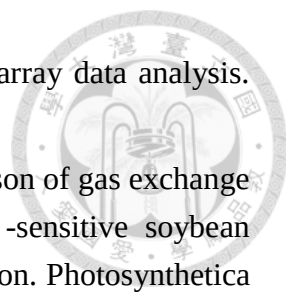
- 
- Chiera, J., J. Thomas, and T. Rufty. 2002. Leaf initiation and development in soybean under phosphorus stress. *J. Expt. Bot.* 53:473-481.
- Chiou, T.J., K. Aung, S.I. Lin, C.C. Wu, S.F. Chiang, and C.I. Su. 2006. Regulation of phosphate homeostasis by microRNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18:412-421.
- Chiou, T.J. and S.I. Lin. 2011. Signaling network in sensing phosphate availability in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62:185-206.
- Chou, M.L., M.C. Shih, M.T. Chan, S.Y. Liao, C.T. Hsu, Y.T. Haung, J.W. Chen, D.C. Liao, F.H. Wu, and C.S. Lin. 2013. Global transcriptome analysis and identification of a CONSTANS-like gene family in the orchid *Erycina pusilla*. *Planta* 237:1425-1441.
- Chuaqui, R.F., R.F. Bonner, C.J. Best, J.W. Gillespie, M.J. Flaig, S.M. Hewitt, J.L. Phillips, D.B. Krizman, M.A. Tangrea, M. Ahram, W.M. Linehan, V. Knezevic, and M.R. Emmert-Buck. 2002. Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments. *Nat. Genet.* 32 Suppl:509-14.
- Cibes, H.R., N.F. Childers, and A.J. Loustalot. 1947. Influence of mineral deficiencies on growth and composition of vanilla vines. *Plant physiol.* 22:291.
- Cordell, D., J.O. Drangert, and S. White. 2009. The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environ. Change* 19:292-305.
- Cozzolino, S. and A. Widmer. 2005. Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? *Trends Ecol. Evolution* 20:487-494.
- Curtis, M.D. and U. Grossniklaus. 2003. A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol.* 133:462-469.
- Devaiah, B.N., A.S. Karthikeyan, and K.G. Raghothama. 2007a. WRKY75 transcription factor is a modulator of phosphate acquisition and root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 143:1789-1801.
- Devaiah, B.N., R. Madhuvanthi, A.S. Karthikeyan, and K.G. Raghothama. 2009. Phosphate starvation responses and gibberellic acid biosynthesis are regulated by the MYB62 transcription factor in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* 2:43-58.
- Devaiah, B.N., V.K. Nagarajan, and K.G. Raghothama. 2007b. Phosphate homeostasis and root development in *Arabidopsis* are synchronized by the zinc finger transcription factor ZAT6. *Plant Physiol.* 145:147-159.
- Dieterle, M., A. Thomann, J.P. Renou, Y. Parmentier, V. Cognat, G. Lemonnier, R. Müller, W.H. Shen, T. Kretsch, and P. Genschik. 2005. Molecular and functional characterization of *Arabidopsis* Cullin 3A. *The Plant J.* 41:386-399.

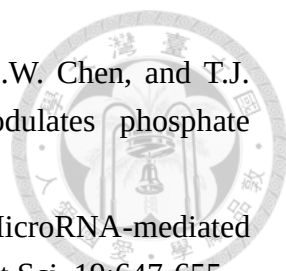
- 
- Dinkelaker, B., V. Römheld, and H. Marschner. 1989. Citric acid excretion and precipitation of calcium citrate in the rhizosphere of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant Cell Environ.* 12:285-292.
- Enstone, D., C. Peterson, and F. Ma. 2002. Root endodermis and exodermis: structure, function, and responses to the environment. *J Plant Growth Regul.* 21:335-351.
- Evans, J. 1989. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C3 plants. *Oecologia* 78:9-19.
- Fredeen, A.L., I.M. Rao, and N. Terry. 1989. Influence of phosphorus nutrition on growth and carbon partitioning in glycine max. *Plant Physiol.* 89:225-230.
- Fu, C.H., Y.W. Chen, Y.Y. Hsiao, Z.J. Pan, Z.J. Liu, Y.M. Huang, W.C. Tsai, and H.H. Chen. 2011. OrchidBase: A collection of sequences of the transcriptome derived from orchids. *Plant Cell Physiol.* 52:238-243.
- González, E., R. Solano, V. Rubio, A. Leyva, and J. Paz-Ares. 2005. Phosphate transporter traffic facilitator1 is a plant-specific SEC12-related protein that enables the endoplasmic reticulum exit of a high-affinity phosphate transporter in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17:3500-3512.
- Griesbach, R. J., 2003. Orchids emerge as major world floral crop. *Chronica Hort.* 43(3):6-9.
- Guidi, L., G. Lorefice, A. Pardossi, F. Malorgio, F. Tognoni, and G.F. Soldatini. 1997. Growth and photosynthesis of *Lycopersicon esculentum* (L.) plants as affected by nitrogen deficiency. *Biol. Plant.* 40:235-244.
- Guo, W.J. and N. Lee. 2006. Effect of leaf and plant age, and day/night temperature on net CO<sub>2</sub> uptake in *Phalaenopsis amabilis* var. *formosa*. *J. Amer. Soci. Hort. Sci.* 131:320-326.
- Hall, J.D., R. Barr, A.H. Al-Abbas, and F.L. Crane. 1972. The ultrastructure of chloroplasts in mineral-deficient maize leaves. *Plant Physiol.* 50:404-409.
- Hamburger, D., E. Rezzonico, J. MacDonald-Comber Petétot, C. Somerville, and Y. Poirier. 2002. Identification and characterization of the *Arabidopsis* PHO1 gene involved in phosphate loading to the xylem. *The Plant Cell Online* 14:889-902.
- Hammond, J.P., M.J. Bennett, H.C. Bowen, M.R. Broadley, D.C. Eastwood, S.T. May, C. Rahn, R. Swarup, K.E. Woolaway, and P.J. White. 2003. Changes in gene expression in *Arabidopsis* shoots during phosphate starvation and the potential for developing smart plants. *Plant Physiol.* 132:578-596.
- Hammond, J.P., M.R. Broadley, and P.J. White. 2004. Genetic responses to phosphorus deficiency. *Ann. Bot.* 94:323-332.
- He, C.J., P.W. Morgan, and M.C. Drew. 1992. Enhanced sensitivity to ethylene in

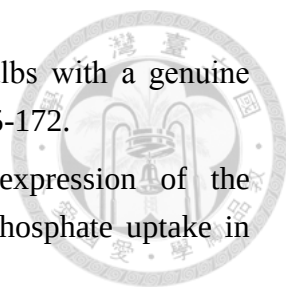
- nitrogen- or phosphate-starved roots of *Zea mays* L. during aerenchyma formation. *Plant Physiol.* 98:137-142.
- Heitholt, J.J., R.C. Johnson, and D.M. Ferris. 1991. Stomatal limitation to carbon dioxide assimilation in nitrogen and drought-stressed wheat. *Crop Sci.* 31:135-139.
- Hermans, C., J.P. Hammond, P.J. White, and N. Verbruggen. 2006. How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? *Trends Plant Sci.* 11:610-617.
- Herrera, R., T. Merida, N. Stark, and C.F. Jordan. 1978. Direct phosphorus transfer from leaf litter to roots. *Naturwissenschaften* 65:208-209.
- Hew, C.S., L.Y. Lim, and C.M. Low. 1993. Nitrogen uptake by tropical orchids. *Environ. Expt. Bot.* 33:273-281.
- Hew, C.S. and C.K.Y. Ng. 1996. Changes in mineral and carbohydrate content in pseudobulbs of the C3 epiphytic orchid hybrid *Oncidium* Goldiana at different growth stages. *Lindleyana* 11:125-134.
- Hew, C.S. and J.W.H. Yong. 2004. The physiology of tropical orchids in relation to the industry. 2nd ed. World Scientific, River Edge, N.J.
- Hoch, W.A., E.L. Zeldin, and B.H. McCown. 2001. Physiological significance of anthocyanins during autumnal leaf senescence. *Tree Physiol.* 21:1-8.
- Hsiao, Y.Y., Y.W. Chen, S.C. Huang, Z.J. Pan, C.H. Fu, W.H. Chen, W.C. Tsai, and H.H. Chen. 2011. Gene discovery using next-generation pyrosequencing to develop ESTs for *Phalaenopsis* orchids. *BioMed Central Genomics* 12:360.
- Hsiao, Y., W. Tsai, C. Kuoh, T. Huang, H. Wang, T. Wu, Y. Leu, W. Chen, and H. Chen. 2006. Comparison of transcripts in *Phalaenopsis bellina* and *Phalaenopsis equestris* (Orchidaceae) flowers to deduce the monoterpene biosynthesis pathway. *BioMed Central Plant Biol.* 6:14.
- Hsing, Y.i.C. 2011. Flowering Research in Taiwan. *Plant Cell Physiol.* 52:1455-1458.
- Hsu, C.C., Y.L. Chung, T.C. Chen, Y.L. Lee, Y.T. Kuo, W.C. Tsai, Y.Y. Hsiao, Y.W. Chen, W.L. Wu, and H.H. Chen. 2011. An overview of the *Phalaenopsis* orchid genome through BAC end sequence analysis. *BioMed Central Plant Biol.* 11:3.
- Huang, M., C. Ma, R. Yu, L. Mu, J. Hou, Y. Yu, and Y. Fan. 2014. Concurrent changes in methyl jasmonate emission and the expression of its biosynthesis-related genes in *Cymbidium ensifolium* flowers. *Physiol. Plant.* Doi/10.1111/ppl.12275
- Huang, T.K., C.L. Han, S.I. Lin, Y.J. Chen, Y.C. Tsai, Y.R. Chen, J.W. Chen, W.Y. Lin, P.M. Chen, and T.Y. Liu. 2013. Identification of downstream components of ubiquitin-conjugating enzyme PHOSPHATE2 by quantitative membrane proteomics in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* 25:4044-4060.



- 
- Huber, S., T. Sugiyama, and R. Alberte. 1989. Photosynthetic determinants of growth in maize plants: effects of nitrogen nutrition on growth, carbon fixation and photochemical features. *Plant cell physiol.* 30:1063-1072.
- Ishioka, N., S. Tanimoto, and H. Harada. 1991. Roles of nitrogen and carbohydrate in floral-bud formation in *Pharbitis* apex cultures. *J. Plant Physiol.* 138:573-576.
- Jacob, J. and D.W. Lawlor. 1992. Dependence of photosynthesis of sunflower and maize leaves on phosphate supply, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity, and ribulose-1,5-bisphosphate pool size. *Plant Physiol.* 98:801-807.
- Johnson, C.R. 1973. Symptomatology and analyses of nutrient deficiencies produced on flowering annual plants. *Commun. Soil Sci. Plant Analysis* 4:185-196.
- Johnson, J.F., C.P. Vance, and D.L. Allan. 1996. Phosphorus deficiency in *Lupinus albus* (altered lateral root development and enhanced expression of phosphoenolpyruvate carboxylase). *Plant Physiol.* 112:31-41.
- Kubota, S., K. Yoneda, and Y. Suzuki. 2000. Effects of ammonium to nitrate ratio in culture medium on growth and nutrient absorption of *Phalaenopsis* seedlings in vitro. *Environ. Control Biol.* 38:281-284.
- López-Arredondo, D.L., M.A. Leyva-González, S.I. González-Morales, J. López-Bucio, and L. Herrera-Estrella. 2014. Phosphate nutrition: improving low-phosphate tolerance in crops. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65:95-123.
- López-Bucio, J., A. Cruz-Ramírez, and L. Herrera-Estrella. 2003. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6:280-287.
- Lambers, H., M.W. Shane, M.D. Cramer, S.J. Pearse, and E.J. Veneklaas. 2006. Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: matching morphological and physiological traits. *Ann. Bot.* 98:693-713.
- Lamont, B. 2003. Structure, ecology and physiology of root clusters – a review. *Plant Soil* 248:1-19.
- Lawanson, A.O., B.B. Akindele, P.B. Fasalojo, and B.L. Akpe. 1972. Time-course of anthocyanin formation during deficiencies of nitrogen, phosphorus and potassium in seedlings of *Zea mays* Linn. var. E.S. 1. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 66:251-253.
- Lee, T. Y., A. Tseng, T. Yeh, and G. Tsung. 2014. An Overview of Taiwan's Orchid Industry, p. 6-13. In: T. Y. Lee (eds.). *Bloom – Taiwan Orchid talks*. Taiwan Orchid Growers Association, Tainan, Taiwan.
- Leitch, I.J., I. Kahandawala, J. Suda, L. Hanson, M.J. Ingrouille, M.W. Chase, and M.F. Fay. 2009. Genome size diversity in orchids: consequences and evolution. *Ann. Bot.* 104:469-481.

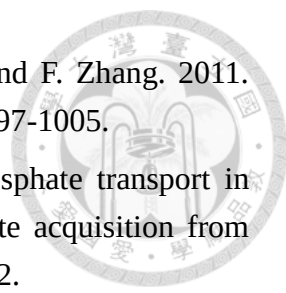
- 
- Leung, Y.F. and D. Cavalieri. 2003. Fundamentals of cDNA microarray data analysis. *Trends Genet.* 19:649-659.
- Li, X.T., P. Cao, X.G. Wang, M.J. Cao, and H.Q. Yu. 2011. Comparison of gas exchange and chlorophyll fluorescence of low-potassium-tolerant and -sensitive soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] cultivars under low-potassium condition. *Photosynthetica* 49:633-636.
- Liang, S., Q.S. Ye, R.H. Li, J.Y. Leng, M.R. Li, X.J. Wang, and H.Q. Li. 2012. Transcriptional regulations on the low-temperature-induced floral transition in an orchidaceae species, *Dendrobium nobile*: an expressed sequence tags analysis. *Comparative and Functional Genomics* 2012: 757801.
- Lima, J.D., P.R. Mosquim, and F.M. Da Matta. 1999. Leaf gas exchange and chlorophyll fluorescence parameters in *Phaseolus vulgaris* as affected by nitrogen and phosphorus deficiency. *Photosynthetica* 37:113-121.
- Lin, C.S., J.W. Chen, Y.T. Huang, C.T. Hsu, H.C. Lu, M.L. Chou, L.C. Chen, C.I. Ou, D.C. Liao, Y.Y. Yeh, S.B. Chang, S.C. Shen, F.H. Wu, M.C. Shih, and M.T. Chan. 2013a. Catalog of *Erycina pusilla* miRNA and categorization of reproductive phase-related miRNAs and their target gene families. *Plant Mol. Biol.* 82:193-204.
- Lin, H.Y., J.C. Chen, M.J. Wei, Y.C. Lien, H.H. Li, S.S. Ko, Z.H. Liu, and S.C. Fang. 2014. Genome-wide annotation, expression profiling, and protein interaction studies of the core cell-cycle genes in *Phalaenopsis aphrodite*. *Plant Mol. Biol.* 84:203-226.
- Lin, S., H. Lee, W. Chen, C. Chen, Y. Kao, Y. Fu, Y. Chen, and T. Lin. 2001. Nuclear DNA contents of *Phalaenopsis* species and *Doritis pulcherrima*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126:195 - 199.
- Lin, W.Y., T.K. Huang, and T.J. Chiou. 2013b. Nitrogen limitation adaptation, a target of microRNA827, mediates degradation of plasma membrane-localized phosphate transporters to maintain phosphate homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25:4061-4074.
- Lin, W.Y., S.I. Lin, and T.J. Chiou. 2009. Molecular regulators of phosphate homeostasis in plants. *J. Expt. Bot.* 60:1427-1438.
- Liu, H.C., G.J. Chen, R.Y. Chen, Y.H. Kuang, and X.Y. Wu. 2004. Anatomical structures of seedlings of *Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis* cultivars under phosphorus deficiency stress. *J. Plant Resources Environ.* 13:48-52.
- Liu, T.Y., K. Aung, C.Y. Tseng, T.Y. Chang, Y.S. Chen, and T.J. Chiou. 2011. Vacuolar  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  transport activity is required for systemic phosphate homeostasis involving shoot-to-root signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 156:1176-1189.

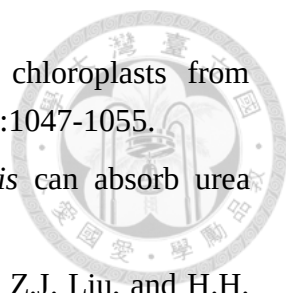
- 
- Liu, T.Y., T.K. Huang, C.Y. Tseng, Y.S. Lai, S.I. Lin, W.Y. Lin, J.W. Chen, and T.J. Chiou. 2012. PHO2-dependent degradation of PHO1 modulates phosphate homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24:2168-2183.
- Liu, T.Y., W.Y. Lin, T.K. Huang, and T.J. Chiou. 2014. MicroRNA-mediated surveillance of phosphate transporters on the move. *Trends Plant Sci.* 19:647-655.
- Longstreth, D.J. and P.S. Nobel. 1980. Nutrient influences on leaf photosynthesis: effects of nitrogen, phosphorus, and potassium for *Gossypium hirsutum* L. *Plant Physiol.* 65:541-543.
- Lynch, J., A. Läuchli, and E. Epstein. 1991. Vegetative growth of the common bean in response to phosphorus nutrition. *Crop Sci.* 31:380-387.
- Maathuis, F.J.M. 2009. Physiological functions of mineral macronutrients. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12:250-258.
- McArthur, D. and N.R. Knowles. 1993. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on the response of potato to phosphorus deficiency. *Plant Physiol.* 101:147-160.
- Menary, R. and J. Staden. 1976. Effect of phosphorus nutrition and cytokinins on flowering in the tomato, *Lycopersicon esculentum* Mill. *Functional Plant Biol.* 3:201-205.
- Millner, P.D. and D.G. Kitt. 1992. The Beltsville method for soilless production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 2:9-15.
- Misson, J., K.G. Raghothama, A. Jain, J. Jouhet, M.A. Block, R. Bligny, P. Ortet, A. Creff, S. Somerville, N. Rolland, P. Dumas, P. Nacry, L. Herrerra-Estrella, L. Nussaume, and M.C. Thibaud. 2005. A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. Amer.* 102:11934-11939.
- Miura, K., A. Rus, A. Sharkhuu, S. Yokoi, A.S. Karthikeyan, K.G. Raghothama, D. Baek, Y.D. Koo, J.B. Jin, and R.A. Bressan. 2005. The *Arabidopsis* SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. Amer.* 102:7760-7765.
- Moreira, A.S.F.P. and R.M.d.S. Isaias. 2008. Comparative anatomy of the absorption roots of terrestrial and epiphytic orchids. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 51:83-93.
- Mudge, S.R., A.L. Rae, E. Diatloff, and F.W. Smith. 2002. Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in *Arabidopsis*. *Plant J.* 31:341-353.
- Nevins, D.J. and R.S. Loomis. 1970. Nitrogen nutrition and photosynthesis in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Crop Sci.* 10:21-25.

- 
- Ng, C.K.Y. and C.S. Hew. 2000. Orchid pseudobulbs – ‘false’ bulbs with a genuine importance in orchid growth and survival! *Scientia Hort.* 83:165-172.
- Nilsson, L., R. Müller, and T.H. Nielsen. 2007. Increased expression of the MYB-related transcription factor, PHR1, leads to enhanced phosphate uptake in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 30:1499-1512.
- Nussaume, L., S. Kanno, H. Javot, E. Marin, N. Pochon, A. Ayadi, T.M. Nakanishi, and M.C. Thibaud. 2011. Phosphate import in plants: focus on the PHT1 transporters. *Front. Plant Sci.* 2:1-12.
- O'Brien, T.P., N. Feder, and M.E. McCully. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59:368-373.
- Oliveira, V.d.C. and M.d.G. Sajo. 1999. Root anatomy of nine orchidaceae species. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 42:405-413.
- Osaki, M., T. Shinano, and T. Tadano. 1993. Effect of nitrogen, phosphorus, or potassium deficiency on the accumulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and chlorophyll in several field crops. *Soil Sci. Plant Nutr.* 39:417-425.
- Péret, B., M. Clément, L. Nussaume, and T. Desnos. 2011. Root developmental adaptation to phosphate starvation: better safe than sorry. *Trends Plant Sci.* 16:442-450.
- Peaslee, D.E. and D.N. Moss. 1968. Stomatal conductivities in K-deficient leaves of maize (*Zea mays*, L.). *Crop Sci.* 8:427-430.
- Peek, C.S., A.D. Robson, and J. Kuo. 2003. The formation, morphology and anatomy of cluster root of *Lupinus albus* L. as dependent on soil type and phosphorus supply. *Plant Soil* 248:237-246.
- Peoples, T.R. and D.W. Koch. 1979. Role of potassium in carbon dioxide assimilation in *Medicago sativa* L. *Plant Physiol.* 63:878-881.
- Peterson, C.A. and D.E. Enstone. 1996. Functions of passage cells in the endodermis and exodermis of roots. *Physiol. Plant.* 97:592-598.
- Pettigrew, W.T. 2008. Potassium influences on yield and quality production for maize, wheat, soybean and cotton. *Physiol. Plant.* 133:670-681.
- Plesničar, M., R. Kastori, N. Petrović, and D. Panković. 1994. Photosynthesis and chlorophyll fluorescence in sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves as affected by phosphorus nutrition. *J. Expt. Bot.* 45:919-924.
- Poirier, Y. and M. Bucher. 2002. Phosphate transport and homeostasis in *Arabidopsis*. In: C.R. Somerville and E.M. Meyerowitz (eds.). *The Arabidopsis Book*. Amer. Soc.

Plant Biol., Rockville, M.D.

- Poole, H.A. and J.G. Seeley. 1978. Nitrogen, potassium and magnesium nutrition of three orchid genera. *J. Amer. Soc. Hortic. Sc.* 103:485-488.
- Pridgeon, A. 1986. Anatomical adaptations in Orchidaceae. *Lindleyana* 1:90-101.
- Pridgeon, A.M. 1987. The velamen and exodermis of orchis roots. p. 141-192. In: J. Arditti (eds.). *Orchid biology: reviews and perspectives IV*. Cornell University Press, Ithaca, N.Y.
- Radin, J.W. and M.P. Eidenbock. 1984. Hydraulic conductance as a factor limiting leaf expansion of phosphorus-deficient cotton plants. *Plant Physiol.* 75:372-377.
- Raghothama, K.G. 1999. Phosphate acquisition. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:665-693.
- Raghothama, K.G. and A.S. Karthikeyan. 2005. Phosphate acquisition. *Plant Soil* 274:37-49.
- Raper, C.D., Jr., J.F. Thomas, L. Tolley-Henry, and J.W. Rideout. 1988. Assessment of an apparent relationship between availability of soluble carbohydrates and reduced nitrogen during floral initiation in tobacco. *Bot. Gazette* 149:289-294.
- Rideout, J.W., C.D. Raper, Jr., and G.S. Miner. 1992. Changes in ratio of soluble sugars and free amino nitrogen in the apical meristem during floral transition of tobacco. *Intl. J. Plant Sci.* 153:78-88.
- Rossiter, R.C. 1978. Phosphorus deficiency and flowering in subterranean clover (*T. subterraneum* L.). *Ann. Bot.* 42:325-329.
- Rubio, V., F. Linhares, R. Solano, A.C. Martín, J. Iglesias, A. Leyva, and J. Paz-Ares. 2001. A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev.* 15:2122-2133.
- Rudall, P.J. and R.M. Bateman. 2002. Roles of synorganisation, zygomorphy and heterotopy in floral evolution: the gynostemium and labellum of orchids and other lilioid monocots. *Biol. Rev.* 77:403-441.
- Sakanishi, Y., H. Imanishi, and G. Ishida. 1980. Effect of temperature on growth and flowering of *Phalaenopsis amabilis*. *Bull. Univ. Osaka. Pref. Ser. B.* 32:1-9.
- Sanford, W.W. and I. Adanlawo. 1973. Velamen and exodermis characters of west african epiphytic orchids in relation to taxonomic grouping and habitat tolerance. *Bot. J. Linnean Soc.* 66:307-321.
- Sarker, B.C., J. Karmoker, and P. Rashid. 2010. Effects of phosphorus deficiency on anatomical structures in maize (*Zea mays* L.). *Bangladesh J. Bot.* 39:57-60.

- 
- Shen, J., L. Yuan, J. Zhang, H. Li, Z. Bai, X. Chen, W. Zhang, and F. Zhang. 2011. Phosphorus Dynamics: From Soil to Plant. *Plant Physiol.* 156:997-1005.
- Shin, H., H.S. Shin, G.R. Dewbre, and M.J. Harrison. 2004. Phosphate transport in *Arabidopsis*: Pht1;1 and Pht1;4 play a major role in phosphate acquisition from both low- and high-phosphate environments. *Plant J.* 39:629-642.
- Silvera, K., L.S. Santiago, J.C. Cushman, and K. Winter. 2009. Crassulacean acid metabolism and epiphytism linked to adaptive radiations in the Orchidaceae. *Plant Physiol.* 149:1838-1847.
- Sinclair, T.R. and T. Horie. 1989. Leaf nitrogen, photosynthesis, and crop radiation use efficiency: a review. *Crop Sci.* 29:90-98.
- Su, C.I., Y.T. Chao, Y.C.A. Chang, W.C. Chen, C.Y. Chen, A.Y. Lee, K.T. Hwa, and M.C. Shih. 2011. De novo assembly of expressed transcripts and global analysis of the *Phalaenopsis aphrodite* transcriptome. *Plant Cell Physiol.* 52:1501-1514.
- Su, C.I., Y.T. Chao, S.H. Yen, C.Y. Chen, W.C. Chen, Y.C.A. Chang, and M.C. Shih. 2013a. Orchidstra: an integrated orchid functional genomics database. *Plant Cell Physiol.* 54:e11.
- Su, C.L., W.C. Chen, A.Y. Lee, C.Y. Chen, Y.C. Chang, Y.T. Chao, and M.C. Shih. 2013b. A modified ABCDE model of flowering in orchids based on gene expression profiling studies of the moth orchid *Phalaenopsis aphrodite*. *PloS One* 8:e80462.
- Susilo, H. and Y.C.A. Chang. 2014. Nitrogen source for inflorescence development in *Phalaenopsis*: II. Effect of reduced fertilizer level on stored nitrogen use. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 139:76-82.
- Susilo, H., Y.C. Peng, and Y.C.A. Chang. 2014. Nitrogen source for inflorescence development in *Phalaenopsis*: I. Relative significance of stored and newly absorbed nitrogen. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 139:69-75.
- Susilo, H., Y.C. Peng, S.C. Lee, Y.C. Chen, and Y.C.A. Chang. 2013. The uptake and partitioning of nitrogen in *Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3' as Shown by <sup>15</sup>N as a tracer. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 138:229-237.
- Taiz, L. and E. Zeiger. 2010. *Plant Physiology*.ed. Sinauer Associates, Incorporated.
- Tanimoto, S. and H. Harada. 1981. Chemical factors controlling floral bud formation of torenia stem segments cultured in vitro I. Effects of mineral nutrients and sugars. *Plant Cell Physiol.* 22:533-541.
- Thibaud, M.C., J.F. Arrighi, V. Bayle, S. Chiarenza, A. Creff, R. Bustos, J. Paz-Ares, Y. Poirier, and L. Nussaume. 2010. Dissection of local and systemic transcriptional responses to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *Plant J.* 64:775-789.

- 
- Thomson, W.W. and T.E. Weier. 1962. The fine structure of chloroplasts from mineral-deficient leaves of *Phaseolus vulgaris*. Amer. J. Bot. 49:1047-1055.
- Trépanier, M., M.P. Lamy, and B. Dansereau. 2009. *Phalaenopsis* can absorb urea directly through their roots. Plant Soil 319:95-100.
- Tsai, W.C., C.H. Fu, Y.Y. Hsiao, Y.M. Huang, L.J. Chen, M. Wang, Z.J. Liu, and H.H. Chen. 2013. OrchidBase 2.0: Comprehensive collection of Orchidaceae floral transcriptomes. Plant Cell Physiol. 54:e7(1-8).
- Tsai, W., Y. Hsiao, S. Lee, C. Tung, D. Wang, H. Wang, W. Chen, and H. Chen. 2006. Expression analysis of the ESTs derived from the flower buds of *Phalaenopsis equestris*. Plant Sci. 170:426 - 432.
- Vesk, M., J. Possingham, and F. Mercer. 1966. The effect of mineral nutrient deficiencies on the structure of the leaf cells of tomato, spinach, and maize. AUS. J. Bot. 14:1-18.
- Wang, X., X. Yan, and R. Lu. 1999. Effects of P nutrition on the leaf anatomic structure of common beans. J. South China Agric. Univ. 20:57-62.
- Wang, Y.T. 1996. Effects of six fertilizers on vegetative growth and flowering of *Phalaenopsis* orchids. Scientia Hort. 65:191-197.
- Wang, Y.T. 2000. Impact of a high phosphorus fertilizer and timing of termination of fertilization on flowering of a hybrid moth orchid. HortScience 35:60-62.
- Wang, Y.T. 2007. Potassium nutrition affects *Phalaenopsis* growth and flowering. HortScience 42:1563-1567.
- Wang, Y.T. 2008. High NO<sub>3</sub>-N to NH<sub>4</sub>-N ratios promote growth and flowering of a hybrid *Phalaenopsis* grown in two root substrates. Hortscience 43:350-353.
- Wang, Y.T. and L.L. Gregg. 1994. Medium and fertilizer affect the performance of *Phalaenopsis* orchids during two flowering cycles. HortScience 29:269-271.
- Wasaki, J., R. Yonetani, S. Kuroda, T. Shinano, J. Yazaki, F. Fujii, K. Shimbo, K. Yamamoto, K. Sakata, T. Sasaki, N. Kishimoto, S. Kikuchi, M. Yamagishi, and M. Osaki. 2003. Transcriptomic analysis of metabolic changes by phosphorus stress in rice plant roots. Plant Cell Environ. 26:1515-1523.
- Watanabe, H. and S. Yoshida. 1970. Effects of nitrogen, phosphorus, and potassium on photophosphorylation in rice in relation to the photosynthetic rate of single leaves. Soil Sci. Plant Nutr. 16:163-166.
- Went, F.W. 1940. Soziologie der Epiphyten eines tropischen Regenwaldes. Ann. Jard. Bot. Buitenzorg. 50:1-98.
- Williamson, L.C., S.P.C.P. Ribrioux, A.H. Fitter, and H.M.O. Leyser. 2001. Phosphate

- availability regulates root system architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 126:875-882.
- Wu, P., H. Shou, G. Xu, and X. Lian. 2013. Improvement of phosphorus efficiency in rice on the basis of understanding phosphate signaling and homeostasis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16:205-212.
- Yadav, S., W. Peterson, and K.W. Easter. 1997. Do farmers overuse nitrogen fertilizer to the detriment of the environment? *Environ. Resource Econ.* 9:323-340.
- Yang, X.J. and P.M. Finnegan. 2010. Regulation of phosphate starvation responses in higher plants. *Ann. Bot.* 105:513-526.
- Yao, H.Y., R.S. Chung, S.B. Ho, and Y.C.A. Chang. 2008. Adapting the Pour-through Medium Extraction Method to *Phalaenopsis* Grown in Sphagnum Moss. *HortScience.* 42:2167-2170.
- Yoneda, K., N. Suzuki, and I. Hasegawa. 1999. Effects of macroelement concentrations on growth, flowering, and nutrient absorption in an *Odontoglossum* hybrid. *Scientia Hort.* 80:259-265.
- Yoneda, K., M. Usui, and S. Kubota. 1997. Effect of nutrient deficiency on growth and flowering of *Phalaenopsis*. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 66:141-147.
- Yu, H. and C.J. Goh. 2001. Molecular genetics of reproductive biology in orchids. *Plant Physiol.* 127:1390-1393.
- Zhang, Z., H. Liao, and W.J. Lucas. 2014. Molecular mechanisms underlying phosphate sensing, signaling, and adaptation in plants. *J. Integrative Plant Biol.* 56:192-220.
- Zhao, D., D.M. Oosterhuis, and C.W. Bednarz. 2001. Influence of potassium deficiency on photosynthesis, chlorophyll content, and chloroplast ultrastructure of cotton plants. *Photosynthetica* 39:103-109.
- Zhao, D., K.R. Reddy, V.G. Kakani, and V.R. Reddy. 2005. Nitrogen deficiency effects on plant growth, leaf photosynthesis, and hyperspectral reflectance properties of sorghum. *EU. J. Agron.* 22:391-403.
- Zhao, M., G. Zhang, D. Zhang, Y. Hsiao, and S. Guo. 2013. ESTs analysis reveals putative genes involved in symbiotic seed germination in *Dendrobium officinale*. *PloS one* 8:e72705.
- Zotz, G. 1999. What are backshoots good for? Seasonal changes in mineral, carbohydrate and water content of different organs of the epiphytic orchid, *dimerandra emarginata*. *Ann. Bot.* 84:791-798.
- Zotz, G. 2004. The resorption of phosphorus is greater than that of nitrogen in senescing leaves of vascular epiphytes from lowland *Panama*. *J. Trop. Ecol.* 20:693-696.



- Zotz, G. and P. Hietz. 2001. The physiological ecology of vascular epiphytes: current knowledge, open questions. *J. Expt. Bot.* 52:2067-2078.
- Zotz, G. and U. Winkler. 2013. Aerial roots of epiphytic orchids: the velamen radicum and its role in water and nutrient uptake. *Oecologia* 171:733-741.

