

嘉南藥理大學 105 年度教師研究補助計畫成果報告

計畫類型	☐ 與業界廠商合作研究 ☒ 重點研究 ☐ 一般個人型研究				
本（子）計畫主持人	高毓瑩	單位	生科系	職級	助理教授
聯絡電話	分機：2523		E-mail	viviakao7175@gmail.com	
本（子）計畫名稱	不同光波長與紅麴誘導因子對金線連組織培養苗及懸浮培養二次代謝物形成之影響				
重點研究總計畫名稱	以物理性、生物性因子誘導及化學半合成方法探討紅麴二次代謝物於功能性化粧品之應用				
重點研究總計畫主持人	李冠漢	單位	藥學系	職級	教授
「與業界廠商合作研究計畫」填寫	廠商名稱				
	廠商出資金額				
執行期限 (核定公告日由研發處填寫)	自核定公告日起至民國 105 年 12 月 31 日止				



研究計畫內容

(一) 摘要

植物在不同的環境刺激之下，可產生各式的次級代謝物，並協助植物度過生物性與非生物性的逆境。台灣重要藥用植物金線連 (*Anoectochilus formosanus* Hayata)，具有「藥王」的美名，許多研究指出其具有改善高血脂、活化巨噬細胞、肝損傷保戶與免疫調節的功能，90 年代從組織培養轉型到農民產業開發，近來已具有相當大的市場規模。近年來，開始有研究人員利用 LED 光處理，預期可加速金線連組培苗生長。本計畫期望在單一波長刺激下，觀察金線連生長型態變化，並探討金線連次級代謝物圖譜，比較基因圖譜與代謝圖譜之相關性，篩選出促進此類次級代謝物的產量的光質條件與品系。

(二) 研究動機與研究問題

近年來，台灣蘭花產業興盛，除供給觀賞花卉市場外，各大研究單位與生技公司陸續開發蘭花系列化妝品，蘭科植物也成為台灣重要化粧品原料來源。金線連為蘭科重要的藥草植物，已經被證實具有改善高血脂、活化巨噬細胞、肝損傷保護與免疫調節等功能，而其細胞萃取物已成為歐洲化妝品原料之一，而相關的功能性成份尚未有相關報告發表。因此，子計畫一擬定利用物理性(光波長)因子提高金線連二次代謝物生產；與生物性因子(紅麴)共培養，提高功能性二次代謝物生產，並加以探討與化妝品相關功能性成分的品系。

(三) 研究方法與步驟

1. 金線連無菌苗材料：購自南投不同農場之金線連瓶苗，將無菌苗進行繼代培養。
2. 不同光質處理：每瓶 12 株苗，每組處理重複 6 瓶。將含節間約 1.5 公分切除後，在植物生長箱生長兩周，之後置於不同光波長處理，以黑暗處理與全螢光燈處理當作對照組，八種光波長(純藍光，純紅光，藍紅光不同比例)包含藍光、紅光、藍光與紅光、藍光紅光與遠紅外光等，觀察並紀錄生長型態。
3. 金線連癒合組織誘導：將無菌苗切約一公分含節間，培養於不同強度之 MS 與 WPM 培養基中，另外添加活性碳與植物生長調節劑 (BA, kinetin 濃度 0.5~1ppm; 2,4-D, IAA, NAA 濃度 0.5~3ppm)，於光照與黑暗中培養兩個月。
4. 將金線連組培苗出栽、馴化並與紅麴共培養。



5. 金線連 DNA/RNA 萃取：取金線連葉子 0.2 公克，加入液態氮研磨後以 2% CTAB 萃取，經酒精沉澱並回溶於 100ul TE 供 ISSR 與 RT-PCR 試驗。
6. 金線連品系鑑定：以 ISSR 引子進行 PCR 反應，確認可鑑定不同品系金線連之引子與 DNA 圖譜。

(四) 實驗結果及討論

1. 金線連無菌苗材料：購自南投不同農場之金線連瓶苗，將無菌苗進行繼代培養。金線連節間抽長需經過兩次繼代培養，約兩個月生長時期可達光質測試高度。
2. 不同光質處理：於不同光波長處理，八種光波長發現全藍光與全紅光對於金線連生長抑制，全紅光處理組，植物呈現白化 (圖 1A)，推測此光源不利於葉綠素生成，也可能抑制光合作用之進行。當金線連生長於不同比例紅藍光的組合，有利於健康的植株生長 (圖 1B, C)。不同光源對於植物生長之影響如圖 2 所示。

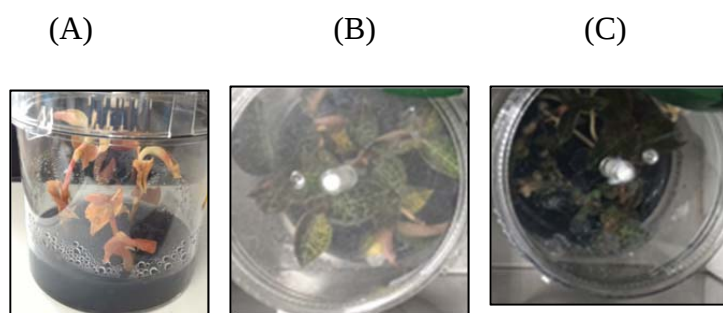


圖 1. 金線連於全紅光 (A) 及紅藍光組合 (B 與 C) 培養下植物生長狀態。



圖 2. 金線連於不同光源下之植物生長狀態。

3. 金線連癒合組織誘導於不同強度之 MS 與 WPM 培養基與植物生長調節劑之處理下，不論是光照與黑暗中培養兩個月皆無癒合組織形成，目前文獻也尚未有癒合組織形成之相關報告，推測蘭科在受傷部位不易以大量細胞團增生的方式修復，尚有未知因素控制癒合組織的形

成。

4. 金線連瓶苗於瓶中生長兩個月，超過兩個節間時，將根部培養基洗淨移至不同配方的土壤(珍珠石、矽藻土、泥炭土)馴化。在密閉的生長盒中生長約一到兩個月新根生成，植物可於25°C 室外環境正常生長。出栽苗與真菌共培養仍在試驗中。
5. 由不同農場取得之金線連瓶苗葉子進行 DNA 萃取，以 2% CTAB 萃取之 DNA 進行 16 組 UBC 引子進行 PCR，以 ISSR 方式探討不同品系的 DNA 圖譜。其中有 11 組引子可產生多型性條帶，目前以 UBC827 可擴增出多條帶，並可做為區分品種的候選引子 (圖 3)。

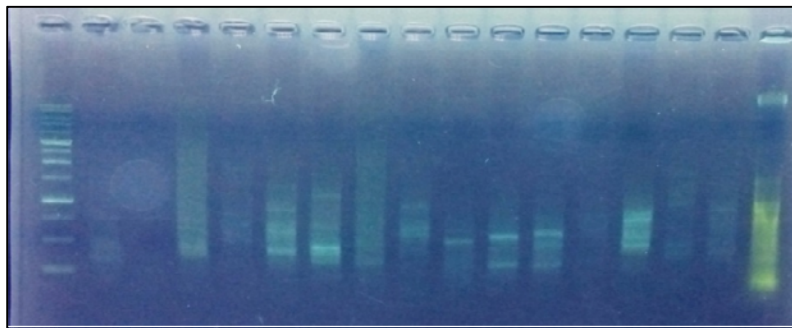


圖 3. 金線連葉片 DNA 以 16 組引子進行 ISSR 試驗

6. 金線連品系鑑定：以 ISSR 引子進行 PCR 反應，利用引子 UBC827 擴增數個樣品，兩家農場瓶苗呈現類似條帶，推測計畫中的瓶苗可能來自同一母瓶 (圖 4)。



圖 4. 不同瓶苗之金線連葉片 DNA 進行 ISSR 試驗



(五) 結論

1. 金線連在不同光質下呈現不同的生長型態，全紅光對金線連瓶苗的生長具抑制作用，而藍紅光的組合有利於金線連的生長，經透氣度高的土壤配方，可成功馴化出栽之金線連瓶苗，並正常生長於室外的自然光源。
2. 本試驗取得之金線連瓶苗經由DNA圖譜，初步鑑定為同一親代，其二次代謝物質成分應相近；然而不同光質下生長型態差異極大，與粧品原料生產相關基因之表達量將在未來試驗中完成。

