

中華民國第 52 屆中小學科學展覽會 作品說明書

高中組 生物（生命科學）科

040719

這稻 4 如此一似 C4 光合作用模式之水稻選殖

學校名稱：國立臺中第一高級中學

作者： 高二 陳亮穎 高二 黃顯博	指導老師： 朱秋欣
-------------------------	--------------

關鍵詞：水稻、光合作用、維管束密度

摘要

隨著糧食需求增加及環境變遷，如何增加作物產量與抗逆境能力成為重要課題。本研究擬藉由增加水稻維管束密度，改造葉片結構使其趨近 C₄ 模式。由台灣水稻插入性突變體庫 (Taiwan Rice Insertional mutant database; TRIM) 選得維管束密度較高 F1, F23, 及 F24 等三個突變株，比對植株表型與 T-DNA 插入之關連性，發現此三個突變株之性狀均與 T-DNA 插入密切相關。其中，F1 突變株維管束密度最高，植株較矮小，更可減少風雨來時植株倒伏死亡的機率；F23 分蘗數增加 47.7%，具有高產量之潛力；F24 突變株維管束密度增加量較低，但植株生長趨於正常，對產量之負面影響較小，加上 T-DNA 插入活化鄰近兩個與逆境反應相關之基因，應具提升產量及逆境耐受性。未來可將這些基因轉殖至水稻中，增加光合作用效率，為糧食危機帶來契機。

壹、研究動機

科學家預測在 21 世紀末之前，人口仍呈對數成長，糧食產量以線性成長的情況下，世界可能因而陷入糧食危機。而增加糧食產量，可以從大多數中低緯度國家的主要糧食作物---水稻著手。

近年來，隨著全球暖化與氣候變遷的問題日益嚴重，未來中緯度甚至高緯度地區的氣候將隨著上述問題變得較濕熱，並可能導致水、旱災頻仍。如此一來，以濕熱地區為生存環境的水稻將是頗具潛力的糧食作物。

玉米甘蔗等 C₄ 植物比起屬於 C₃ 植物的水稻在光合作用中多了某些增加產量的特殊機制(詳見文獻探討)。其中，維管束密度 (Vein Density) 也是影響光合作用效率的重要因素之一，目前已知 C₄ 植物的維管束密度較 C₃ 植物為密集，這會使二氧化碳擴散的時間較短，因而使養分合成效率增加。

因此，欲達到增加糧食產量的目的，可藉由改變水稻的基因來達成，使水稻的光合作用過程較趨近於 C₄ 植物。

貳、研究目的

本實驗將以分子生物學的方式探討水稻性狀與其維管束發育相關基因作用之關係。目的即是為了一步步創造似 C₄ 模式之水稻，期能增加其養分、水分利用效率，以產生高產或較能抗逆境的水稻甚而其他穀類作物，以解決糧食問題。然而 C₄ 與 C₃ 植物的葉片構造最大的差異點是維管束的距離（密度）較近、完整結構之維管束鞘細胞及葉肉細胞所形成之環狀構形的 Kranz 結構。因此，本研究的目的是希望能找出增加水稻維管束密度，縮短維管束距離的基因，進而改良稻作葉片結構，使其趨向於 C₄ 植物之葉片構形，以增加水稻的光合作用效率。

參、研究設備及器材

一、研究藥品

編號	名稱	主要成分	廠牌名
(一)	乙醇(ethyl alcohol)		MERCK
(二)	漂白水	2.5%次氯酸鈉	CLOROX
(三)	無菌水		
(四)	CTAB 陽離子界面活性劑	2% CTAB、 1.4 M NaCl、 0.2% β -mercaptoethanol、 20 mM EDTA、 100 mM Tris-HCl, pH8.0	MERCK
(五)	液態氮		
(六)	chloroform/isoamyl alcohol 溶液	體積比 24:1	MERCK
(七)	RNase		
(八)	2.5 mM dNTP		BioRon
(九)	10mM primer (Forward/Reverse)		1 st Base
(十)	DMSO		MERCK
(十一)	5U/ml Taq 酵素	Go-Taq	Promega
(十二)	6x DNA loading dye		
(十三)	TAE buffer	每 1L : 242 g Tris base ($C_4H_{11}NO_3$) 57.1 ml acetic acid (CH_3COOH) 100 ml ,0.5 M EDTA ,PH 8.0	Tris SIGMA
(十四)	瓊脂膠體(Agarose)		AMRESCO
(十五)	溴乙烷(EtBr)		
(十六)	Trizol		Invitrogen
(十七)	異丙醇(isopropanol)		MERCK
(十八)	DEPC		MDBio
(十九)	RQ1 RNase-free DNase (1 Unit/ μ l)		RQ1, Promega
(二十)	oligo dT ₁₆		
(廿一)	RNase inhibitor		Invitrogen
(廿二)	Reverse Transcriptase		Invitrogen, Superscript III

二、研究器材

編號	名稱	型號或規格	廠牌名
(一)	超音波震盪器	BRANSON 3200	BRANSON
(二)	無菌操作台	3HT-24	海天
(三)	MS 培養基	M519	PhytoTechnology Laboratories
(四)	植物生長箱	LG-1500	LIEN SHEN
(五)	試管		
(六)	手提式顯微鏡	Dino-Lite Pro2	ANMO Electronics Co.
(七)	BLASTN 程式		
(八)	Vector NTI 程式		
(九)	研鉢、研磨棒		
(十)	1.5ml eppendorf	1.5 ml	AXYGEN
(十一)	PCR 管		
(十二)	乾浴器	SKC-40	KYLINE
(十三)	低溫離心機	KUBOTA 3700	KUBOTA
(十四)	真空乾燥機	Speed Vac RH8-18	Savant
(十五)	分光光度計	ND-1000	Nanodrop
(十六)	4°C 冰箱	LSF-1500	LIAN SHEN
(十七)	-20°C 冰箱	1-800-742-23/5	CARAWELL
(十八)	-80°C 冰箱	MDF-392	SANYO
(十九)	PCR 儀器	PTC-20	MJR
(二十)	電泳槽	Mupid-2plus	ADVANCE
(廿一)	紫外光顯影機	GEL LOGIC 100 IMAGING System	UVP
(廿二)	TIGR、RiceGAAS 資料庫		



超音波震盪器



無菌操作台



植物生長箱



手提式顯微鏡



研鉢、研磨棒



1.5ml eppendorf



乾浴器



低溫離心機



真空乾燥機



PCR 管



分光光度計



PCR 儀器



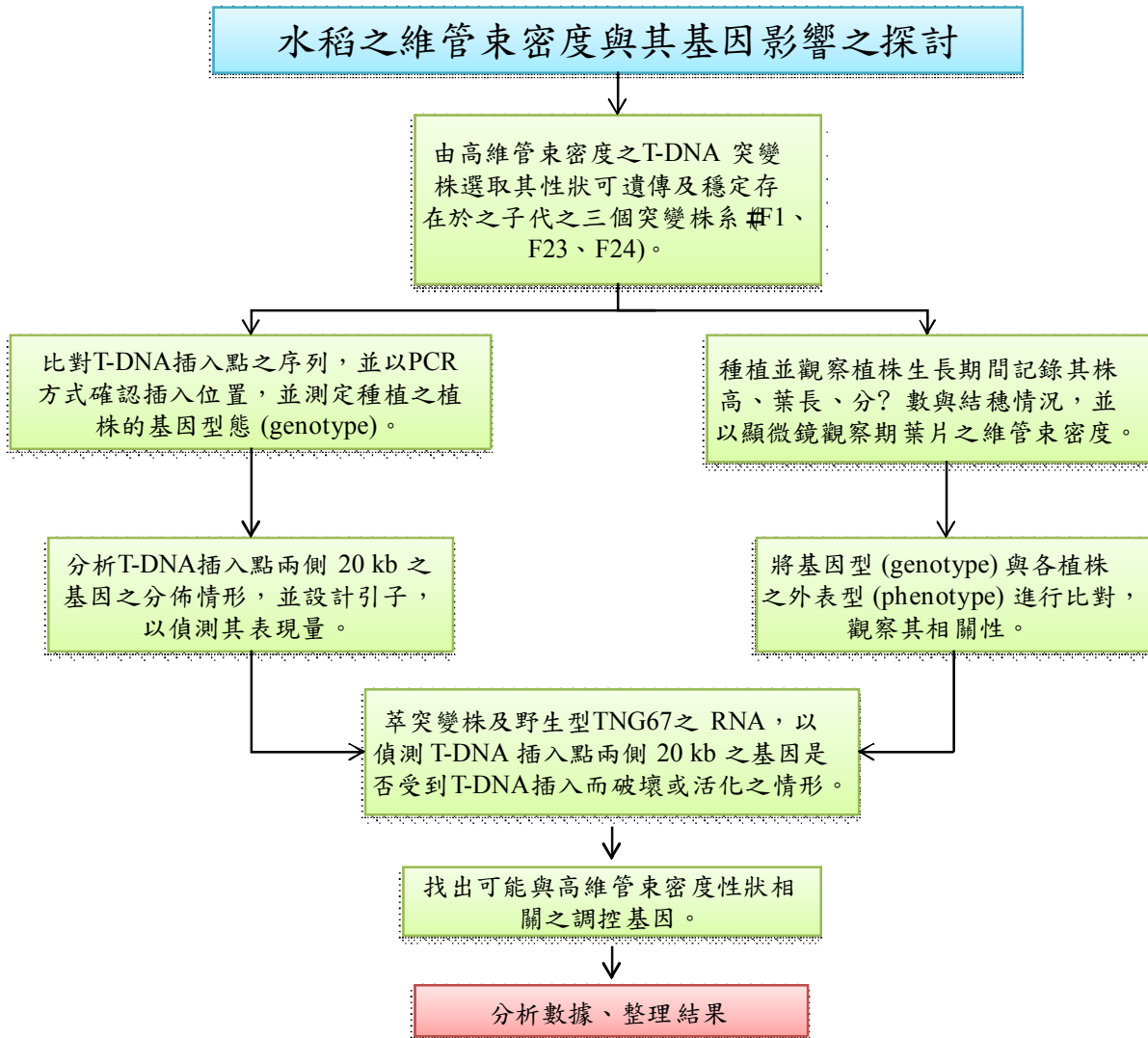
電泳槽



紫外光顯影機

肆、研究過程或方法

一、實驗流程圖



二、實驗原理

(一)水稻簡介

水稻，學名 *Oryza sativa*，為現今世界除了小麥及玉米外最主要之穀類作物，為全世界過半數人口之主食，也是歷史最悠久的糧食作物之一。目前歸類於被子植物門、單子葉植物綱、禾本目、禾本科、稻屬之中。水稻有 12 對染色體，約有 38,000 個基因，目前以水稻為主要糧食的國家大多位於亞熱帶、熱帶與日本，隨灌溉技術的改良，現今甚至在部分溫帶地區也可以見到水稻的蹤影。然而，稻作之生產極易受到栽培環境（土壤、溫度及水分）與病蟲害的影響，據估計每年因病蟲害即可使稻作產量減少將近 50%；

因此，如何改進稻米農藝性狀，及增加其抗病蟲害和抗逆境等能力以增加稻米之收穫量，成為稻米育種學家極為關心的課題。

(二)C₄光合作用簡介

現今植物大略可依其光合作用型式分為 C₃植物與 C₄植物，C₃植物（如稻米）絕大多數的葉綠體分布於葉片中的葉肉細胞（Mesophyll cell ,M cell）之中，C₄植物（諸如甘蔗、玉米等禾本科的植物）的葉綠體大多位於包覆在葉肉細胞外的維管束鞘細胞（Bundle-sheath cell ,BS cell）。

在植物的光合作用中，大致可分為固碳反應與光反應；固碳反應為 C₄ 光合途徑中之第一主要步驟；C₃植物中之光合作用主要酵素 ribulose biphosphate carboxylase oxygenase (Rubisco)可參與 CO₂ 及 O₂ 之固定，同時扮演光合作用或呼吸作用反應之催化，而產生 CO₂ 及 O₂固定上之競爭，因而降低光合作用之效率，尤其是在高溫的環境下，Rubisco 結合 CO₂的效能會更明顯的降低。而 C₄植物，則會先將 CO₂與葉肉細胞中的磷酸烯醇式丙酮酸（phosphoenopyruvate, PEP）結合產生四碳的有機酸，草醯乙酸（Oxaloacetate），而後將草醯乙酸轉化為蘋果酸（Malate）並分解為 CO₂與丙酮酸（Pyruvate），此過程被稱為「C₄路徑（C₄ Pathway）」，產生的 CO₂接著進入卡爾文循環產生葡萄糖，而由於 C₄路徑的加工使 C₄植物的維管束鞘細胞中的 CO₂濃度較高，便可因而加速固碳反應速率。

在 C₃植物的固碳反應中，CO₂與卡爾文循環中的核酮糖二磷酸（RuBP）經由「核酮糖羧化酶（rubisco）」結合以進入卡爾文循環；而 C₄的光合作用中，使 CO₂進入 C₄路徑中的酵素為「PEP 羧化酶(PEP carboxylase)」。與 rubisco 比較，PEP carboxylase 與 CO₂的親和力較高，因此，PEP carboxylase 較 rubisco 能有效固定 CO₂。光反應正如其名，乃藉由光的能量分解 H₂O 為氫離子 H⁺、氧氣 O₂與電子(e⁻)並提升電子之能量，在利用其能量還原產生菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)與三磷酸腺苷(ATP)以儲存能量。

由上述條件可知，在養分的產生上，C₄植物的效率顯然會比 C₃植物多。

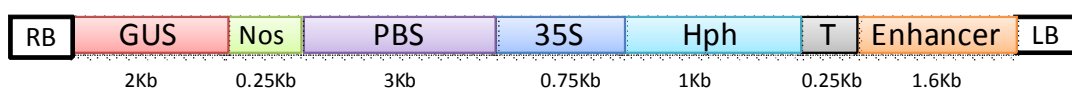
(三)利用 T-DNA 突變體探討水稻基因功能

基因突變是研究植物基因功能中最直接的方法；現階段可使基因產生突變的方法大致上分為三大類：

- 1.物理誘變，例如：照射短波輻射使其發生基因突變
- 2.化學誘變，例如：使用疊氮化鈉 (Sodium Azide, NaN_3) 使其發生基因突變
- 3.利用分子生物學方法，包括 anti-sense 或 RNAi 所造成之基因靜默法 (gene silencing)、同源性基因重組 (homologous recombination) 所造成之標的基因修飾法及以跳躍因子或 T-DNA 插入基因中造成插入性突變法。

現今最被廣泛使用的分子生物技術為 RNA 干擾 (RNAi) 與 T-DNA 插入兩種，RNA 干擾乃利用一段針對目標基因設計之 RNA 片段(反密碼子)與目標植株體的 mRNA 結合，產生一段雙股 RNA，再利用生物體本身有分解雙股 RNA 片段的機制進而達到破壞該段基因的目的 (即 knock-out)。然而，同一條 mRNA 上可能會有數段的序列相同，而被不同對染色體所轉錄而成的 mRNA 中，也會有相同的序列，因此在 RNAi 的過程中，雖然可以達到同時破壞數個基因的效果，卻可能會使目標基因以外的基因不被表現，再者，利用 RNAi 難以確定目標基因的對偶基因被破壞的情形 (亦即在兩條染色體上的基因是否皆被不活化)。

利用 T-DNA 插入法，由於通常被插入基因的數目很少 (平均最多約為 1-3 copies)，因此，容易知道產生突變的基因，進一步將突變的基因分離出來；加上轉入 T-DNA 的植株經多代繁殖後頗為穩定，不易產生重組；加上近年來，將 T-DNA 之載體加以改進，使此法能應用於啟動子的捕捉 (promoter trapping) 及基因功能活化之探討 (activation tagging)；因此，是目前用來探討基因功能相當普遍的方法。



圖一 T-DNA 片段示意圖，其中 RB、LB 分別為兩邊緣之序列，PBS 為 pBluescript vector(載體)，35S 為 CaMV 35S 啟動子，Enhancer 為 4X 35S 促進子。

三、實驗步驟

(一)觀察水稻突變株之表型

1. 材料之播種

利用 *Oryza sativa* L. cv Tainung 67 之水稻栽培種為本試驗之野生型品種。突變株及野生型之種子均脫去內外穎，以 70% EtOH 清洗一次，再泡入 2.5% 漂白水後進行超音波震盪 17 分鐘。倒除漂白水後，於無菌操作台中以無菌水清洗三次後，將種子播種於 Murashige & Skoog basal medium (MS 培養基) (Phytotechnology Laboratories) 上，並置於植物生長箱以 30°C, 16 小時光照及 8 小時黑暗之培養箱中培養。

2. 田間種植與定期觀察

待水稻生長數日後，可移至較大之試管使其繼續生長。約在播種之後 30 天移植至實驗田中，並定期至實驗田觀察其表型特徵，並於植株成熟後（約 110 DAI）取完全展開葉之下位葉中間部位，利用手提式顯微鏡 (Dino-Lite, Digital Microscope Pro2) 偵測及照相其維管束分佈情形。

(二)確認水稻植株 T-DNA 插入之合子型態

1. 突變株之選取

由國際水稻研究組織 (International Rice Research Institute, IRRI) 及中研院分生所團隊共同合作，所選取的高維管束密度之 T-DNA 插入性水稻突變株中，選取其中性狀表現可穩定遺傳於子代，並已有 T-DNA 插入點基因序列的三個突變株系 F1、F23 及 F24 進行觀察與實驗。

T-DNA 插入點之確認與基因型態分析，首先將由 Plasmid rescue 或 TAIL-PCR 方法所得之 T-DNA 插入點兩側之序列於 NCBI 資料庫之 BLASTN 程式進行比對得知 T-DNA 插入點所在之 BAC 複製點及插入方向。再根據 Winkler 等人 (Winkler et al., 1998) 所提 reverse genetics 的方法，以 T-DNA/Rice 插入點兩側序列片段之基因序列，設計兩端之序列專一性引子 (forward 及 reverse)，與 T-DNA 載體上一端

互補之引子 (RB or LB) 交替進行 PCR，以確認 T-DNA 是否插入如資料庫預測之基因序列中。

2. 稻米 genomic DNA 抽取 (DNA extraction)

利用 CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) 陽離子界面活性劑溶解植物細胞壁、細胞膜和硬組織的能力，並與 DNA 形成複合物，另可使蛋白質及醣類物質沉澱下來，達到分離效果。將葉片以液態氮研磨至粉末，置於 1.5ml eppendorf 中，加入約 700 μ l CTAB 緩衝液 (2% CTAB、1.4 M NaCl、0.2% β -mercaptoethanol、20 mM EDTA、100 mM Tris-HCl, pH8.0)，在 60 $^{\circ}$ C 乾浴器中放置 30 分鐘並且每 10 分鐘將之搖勻。再加入約 700 μ l 之 chloroform/isoamyl alcohol (體積比 24:1) 震盪均勻，置於室溫下離心 12000 rpm、10 分鐘。取上清液置入新的 eppendorf 中，再加入上清液兩倍體積之 100% EtOH，輕輕搖晃，並以 4 $^{\circ}$ C、12000 rpm 離心十分鐘。去掉上清液後，加入約 400 μ l 75% EtOH，並搖晃至 pellet 漂起。在 4 $^{\circ}$ C 下以 12000 rpm 離心 10 分鐘後，去掉上清液，吸乾並放入真空乾燥 10 分鐘。加入 30 μ l 之 ddH₂O 以回溶 DNA，再加入 0.1 倍回溶液體積之 RNase (1 μ g/ μ l) 混合均勻，置於 37 $^{\circ}$ C 下作用 30 分鐘，以去除殘留之 RNA。最後在室溫下以 12000 rpm 離心 5 分鐘，取上清液至新的 eppendorf，置於 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

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

在 0.2 ml eppendorf 中加入 10X PCR buffer 1.5 μ l、2.5 mM dNTP 1.2 μ l、10mM primer (Forward/Reverse)各 0.35 μ l、60% DMSO 0.75 μ l 與 5U/ml Taq 酵素 0.12 μ l，並加入 500 ng 之 DNA 後，加 ddH₂O 至總體積為 15 μ l。

再將混合液置於 PCR 儀器中依下列條件進行 PCR 反應： 94 $^{\circ}$ C，4； 94 $^{\circ}$ C，1 分鐘→適當的引子黏合溫度 (50~65 $^{\circ}$ C)，1 分鐘→72 $^{\circ}$ C，1~2 分鐘， 重複循環 28~32 個循環， 72 $^{\circ}$ C 下作用 5 分鐘，並置於 4 $^{\circ}$ C 下保存。

4. 膠體電泳(gel electrophoresis)分析

將上述 PCR 反應之產物 15 μ l 之中加入 3 μ l 之 6x DNA loading dye，將之混合均勻後，取出 7 μ l，置入裝有 0.5 倍 TAE buffer 電泳槽中之瓊脂膠體(Agarose)，並以 100 V 之電壓進行電泳約 40 分鐘後，將膠體置入溴乙烷 (ethidium bromide, EtBr) 中染色 10 分鐘，再以 ddH₂O 退染 5 分鐘，並置於紫外光下檢視其條帶。

(三) 確認 T-DNA 對插入點周圍之基因表現情形之影響

利用 The Institute for Genomic Research (TIGR) database (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/osa1/irgsp.shtml>), 及 Rice Genome Annotation (RiceGAAS) database (<http://ricegaas.dna.affrc.go.jp>) 等資料庫，分析 T-DNA 插入點兩側各約 20 kb 區間之基因分佈及與 T-DNA 構築上強化子之距離。並設計基因專一性之引子。分別以野生型及突變株之 cDNA 進行 RT-PCR 反應，以偵測基因表現情形是否受到 T-DNA 之活化或抑制。

1. RNA 抽取 (RNA extraction)

將 15 DAI 的葉片以液態氮磨成粉末，加入 1 ml Trizol, Invitrogen Co.)，置於 1.5 ml eppendorff 中，置於室溫 5 分鐘後，以 4°C，12,000 rpm 離心十分鐘 (Sigma...)，取上清液至新的 1.5 ml eppendorff，加入 200 μ l chloroform 並劇烈搖晃，室溫靜置 5 分鐘。以 4°C，12,000 rpm 離心十五分鐘後取上清液至新的 1.5 ml eppendorff，加入 400 μ l isopropanol，輕輕搖晃混勻，置於室溫 10 分鐘。以 4°C，12,000 rpm 離心十分鐘，去除液體，將 RNA pellet 加入 1 ml 75 %酒精清洗，再離心。以 100 %酒精重複上列動作。除去液體並以冷凍乾燥離心機乾燥 RNA pellet 後，將 RNA 回溶於 DEPC 處理過之無菌水水，以分光光度計測訂 RNA 濃度及品質，並保存於-80°C。

2. RNA 反轉錄 (RT-PCR)

RNA 在反轉錄之前先取 15 μ l 與 2 μ l RQ1 RNase-free DNase (1 Unit/ μ l; RQ1, Promega) 及 3 μ l 10X reaction buffer 混合, 置於 37°C 下 30 分鐘, 再加入 2 μ l RQ1 DNase stop solution, 置於 65°C 下 10 分鐘, 然後進行 RNA 定量。由測得的 RNA 濃度, 分別取出含 5 μ g 的 RNA 液與 1 μ l oligo dT₁₆ 及 1 μ l 10 mM dNTP 混合, 然後加 DEPC 處理過之 d.I. 水到 13 μ l, 置於 65°C, 5 分鐘, 插入碎冰中冷卻 1 分鐘。而後加入 4 μ l 5X first strand buffer、1 μ l 0.1M DTT、1 μ l RNase inhibitor 及 1 μ l Reverse Transcriptase (Superscript III, Invitrogen Co.) 混合, 依序置於 25°C, 5 分鐘; 50°C, 1 小時; 70°C, 15 分鐘; 反應完成之 cDNA 可以基因專一性引子進行 PCR 反應, 以偵測基因表現情形, 或儲存於 -80°C 冰箱中。

伍、研究結果

一、高維管束密度突變株之篩選

由國際水稻研究組織 (International Rice Research Institute, IRRI) 及中研院分生所團隊共同合作於 2009-II, 2010-I 及 2010-II 共三期作針對台灣 T-DNA 插入性突變的水稻突變體庫 (Taiwan Rice Insertional Mutants Database; TRIM) 的 T₁ 植株共 11,000 株篩選高維管束密度突變株, 選得 35 個高維管束密度突變株系, 約佔總篩選品系之 0.3% (表一)。進一步檢測其 T₁ 及 T₂ 子代之維管束密度, 共有十一個品系呈現穩定性的高維管束密度之現象 (表二), 本實驗將進一步分析其 T-DNA 插入與維管束密度之相關性, 進一步瞭解造成高維管束密度之分子機制。

表一 各突變株之第一子代 T1 中，擁有高維管束密度之個體比例。

Line	Identified cropping season	Ratio of progeny with a high vein density
		T ₁
F19	2009-II	2:12
F21	2009-II	1:12
F25	2009-II	1:12
F22	2009-II	1:12
F20	2009-II	2:12
F24	2009-II	1:12
F23	2009-II	1:12
F14	2010-I	1:11
F13	2010-I	1:12
F1	2010-I	9:11
F9	2010-I	1:12
F11	2010-I	1:12
F7	2010-I	1:12
F16	2010-I	2:11
F12	2010-I	1:10
F5	2010-I	2:9
F4	2010-I	2:10
F6	2010-I	1:12
F3	2010-I	1:10
F15	2010-I	1:11
F2	2010-I	1:12
F10	2010-I	1:8
F18	2010-I	1:12
F8	2010-I	1:1
F26	2010-II	2:12
F27	2010-II	1:11
F28	2010-II	1:11
F29	2010-II	2:12
F33	2010-II	1:12
F30	2010-II	1:12
F31	2010-II	4:12
F34	2010-II	1:12
F32	2010-II	2:12
F35	2010-II	4:12

表二 在第一子代與第二子代皆大量表現高維管束密度之突變株。

Temp. no. in C4 project	FST available	Identified cropping season	Ratio of progeny with a high vein density		
			T ₁ ^a	T ₁ ^b	T ₂
F1	OK	2010-I	9:11	9:10	0:20
F2	OK	2010-I	1:12	12:12	0:18
F3	OK	2010-I	1:10	5:9	2:20
F4	OK	2010-I	2:10	8:11	2:15
F9		2010-I	1:12	6:12	0:20
F11	OK	2010-I	1:12	4:12	2:19
F18	OK	2010-I	1:12	3:11	1:17
F19		2009-II	2:12		16:49
F21		2009-II	1:12		1:48
F23	OK	2009-II	1:12		2:19
F24	OK	2009-II	1:12		2:18

a. 第一子代之兩個月大的未成熟株培養於國立中興大學實驗田

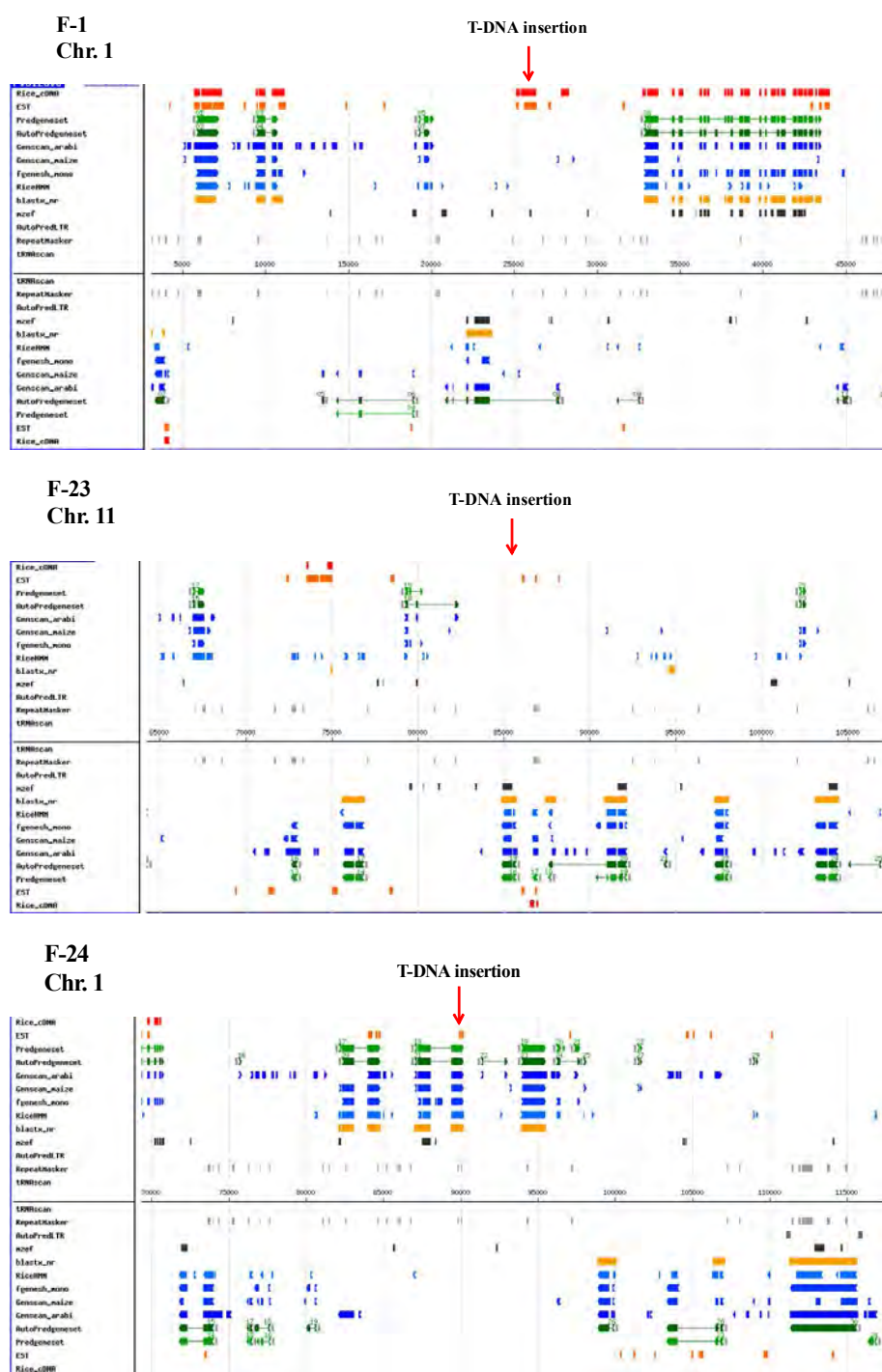
b. 第一子代之成熟株培養於國立中興大學實驗田

二、高維管束密度突變株之 T-DNA 插入點偵測及基因型態分析

T-DNA/Rice 插入點之偵測方式中研院南部生物技術中心協助，參照 1995 年 Liu 及 Whittier (Liu and Whittier, 1995) 所提出 Thermal asymmetric interlaced (TAIL) PCR 的方法及 Koncz 等人於 1990 年所提之 Plasmid rescue 的方法(Koncz et al., 1990)進行檢定。表中除 F9， F19 及 F21 三個品系未檢測出外，其餘八個品系之插入點均已定位成功。因此，本實驗以選取其中維管束密度較高的三個品系 F1， F23 及 F24 進行進一步性狀觀察、插入點確定及基因型態分析。

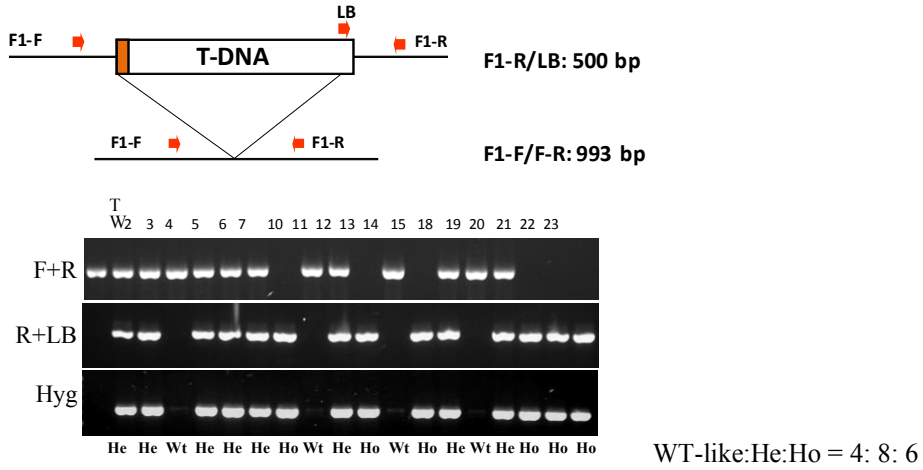
F1， F23 及 F24 之 T-DNA 插入點分別在染色體 1, 11, 1 (圖二)。先以聚合酶連鎖反應偵測 *GUS*、hygromycin resistant gene (*hph*) 之基因片段當作 T-DNA 構築存在於突變株基因體中之標誌；再分別針對各個突變株之插入點兩側設計正向 (forward, F) 及反向 (reverse, R) 兩條引子，分別以 F 與 R 引子對及 F 或 R 與 T-DNA 構築上之 LB 或 RB 引子進行聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR) 以確認突變株中 T-DNA 插入之基因型態，可將植株分類為同型合子(T/T)、異型合子(T/W)與似野生型(W/W)三種基因型態(其中 T 代表為 T-DNA 所插入，W 則為未被插入)。由圖二顯示，F1， F23 及 F24 基因

體中之 T-DNA 插入數目可能均為單一插入，因為，三個突變株系之子代中的似野生型也均無其他 T-DNA 之存在，但仍須進一步以南方墨點法加以確認之（圖三）。此外，連續兩期作 F24 之子代中（2011-I 及 2011-II）均沒有同型合子(T/T) 之存在，可能是由於其 T-DNA 插入造成同型合子(T/T) 無法存活或發芽。

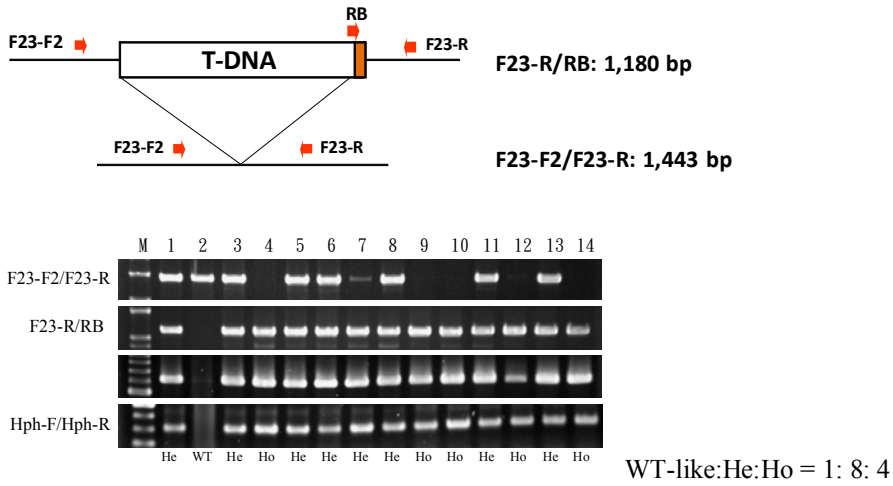


圖二 F1、F23 與 F24 之插入點分別位於第 1、11 與 1 條染色體，此基因分布圖取自 RiceGAAS 資料庫。(http://ricegaas.dna.affrc.go.jp/)

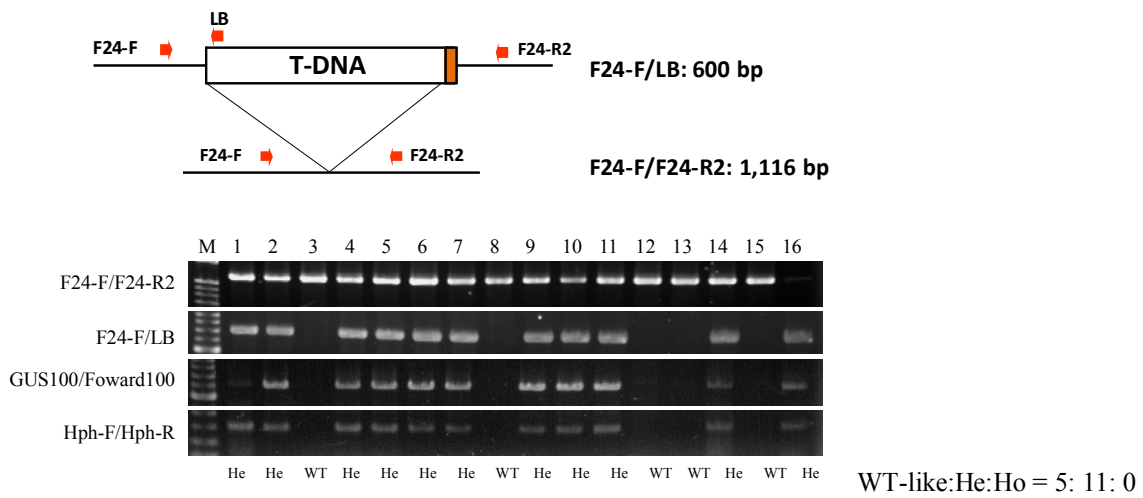
A



B



C



圖三 突變株 F1、F23 與 F24 之基因型，圖中塗色部分為 T-DNA 之 right border 部分(WT-like 為似野生型，He 為異型合子之突變株，Ho 為同型合子之突變株)

陸、討論

一、基因型態與高維管束密度性狀之關連性：

分別將 F1, F23 及 F24 之 T₂ 種子發芽並種植於田間，並觀察其株高、分蘗、維管束密度、葉寬及產量等農藝性狀。

(一)F1 為一矮化、高分蘗數、極高維管束密度之突變株，且其性狀均與 T-DNA 之插入呈密切相關性：

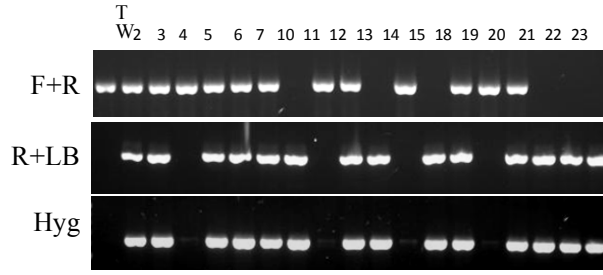
F1 為十一個高維管束密度突變株系中，維管束密度最高者，其 2mm 寬的葉片中維管束數量約為野生型的 1.46 倍（圖四 C），其植株亦呈現矮株，高分蘗數，分蘗數約為矮株之 2.9 倍（圖四 A, C）；葉片較短而深綠、寬度較窄（圖四 B, C），而所有之變異性狀均與其 T-DNA 插入之基因型態呈共分離的現象。F1 雖然呈現 C₃-C₄ 過渡型態中之矮化、分蘗數及維管束密度增加之性狀，但由於過渡矮化，導致穗長也明顯縮短，因此，產量也明顯降低，F1 之同質品系之總穀粒產量只有 F1 分離的野生型之 70%（圖四 D），並不符合預期中之高產 C₄ 模式水稻。然而，F1 之 T-DNA 剛好插入於 micro RNA 156b 及 156c 之前趨物之間（圖五），根據前人的研究發現，大量表現 RNA 156b 或 RNA 156h 也會產生類似的性狀 (Xie et. al, 2006)，但之前的研究並未注意到此基因表現會改變維管束之發育，因此，這將成為 C₃-C₄ 植物光合作用調控基因探討的一項新的議題。

A



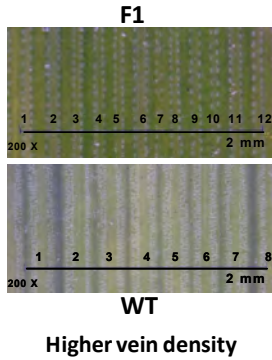
WW N
T/W M
T/T S
20111011

Plants in 2011-II: WW : TW : TT = 21 : 50 : 21



Phenotype N M M N M M S N M S N S M N M S S S

B



Higher vein density

C

TRIM No.	Plant height	Tiller No.	Chlorophyll	Vein density	Leaf width	Leaf length
TNG67	97.9	10.7	34.0	8.6	1.35	25.74
M111350	48.4	29.7	31.7	12.7	0.79	17.52

D

Mutant No.	TNG67	F1	
		F1-WW	F1-T/T or TW
Total yield/plant(g)	32.39 ± 7.11	24.02 ± 7.28	16.94 ± 26.80
Fertile seeds/plant	1214.32 ± 269.84	869.64 ± 257.53	662.60 ± 948.91
1000 grain weight (g)	26.69 ± 0.78	27.54 ± 1.12	20.96 ± 4.30
Fertility (%)	90.10 ± 4.53	82.40 ± 16.80	73.42 ± 17.73
Grain No./panicle	135.08 ± 15.25	107.12 ± 14.36	41.08 ± 55.85
Panicle No./plant	9.99 ± 1.92	10.00 ± 2.37	21.20 ± 13.33
Panicle length (cm)	20.46 ± 1.04	18.14 ± 1.05	10.09 ± 5.88
Plant height. (cm)	107.70 ± 5.95	100.45 ± 3.30	72.60 ± 20.89
Tiller	10.14 ± 2.03	10.27 ± 2.20	29.20 ± 12.70
Plant No.	79	18	5

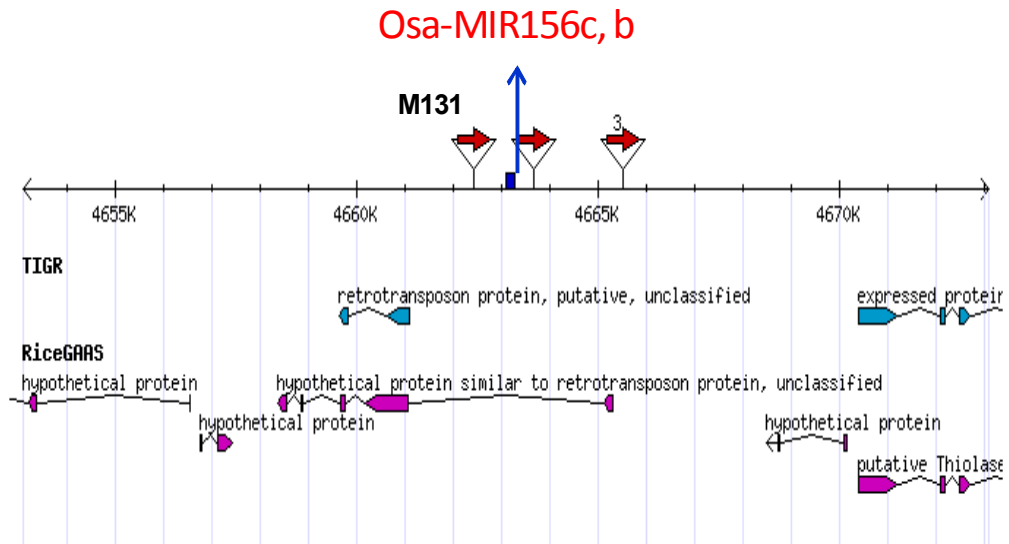
圖四 F1 為突變株之中維管束密度最高者，其表現型之變化(矮化、分蘗數較多或維管束密度較高)與 T-DNA 插入與否呈現高度的相關性：

圖 A 播種後 90 天之植株外觀，其中 W/W 為似野生型，T/W 表異型合子，T/T 表同型合子；N 為正常株高，M 為輕微矮化，S 為嚴重矮化)。

圖 B 第二片成熟葉之維管束照片；其中的數字表示 2mm 之內的維管束數量。

圖 C 突變株 F1 的生長數據，其中葉片的外觀以下位葉為測量對象

圖 D 產量結果

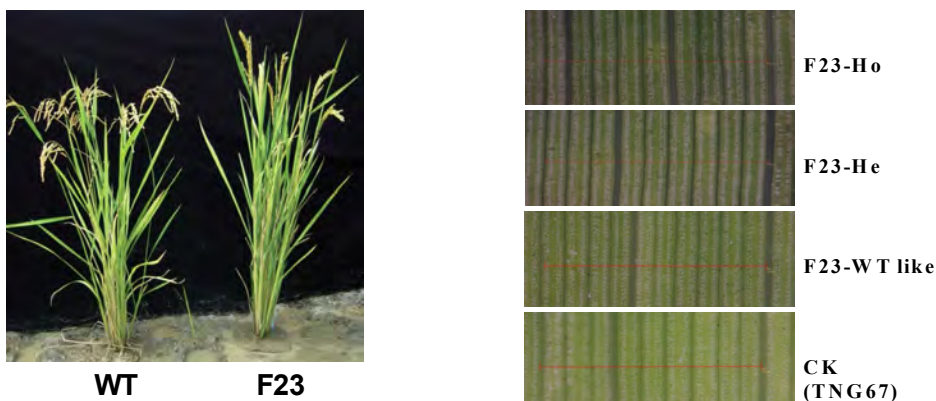


圖五 在突變株 F1 之 T-DNA 插入點兩側分別有兩段 micro RNA 的前驅物(Osa-MIR156b and Osa-MIR156c)，而有一插入點與其相近的突變株 M131 亦表現出與 F1 相似的表型——穀粒較小、葉色較深、葉寬較窄、稻桿較細或半矮株等

(二)F23 為一高分蘗數但維管束密度沒有增加之突變株，且其分蘗數與 T-DNA 之插入呈密切相關性：

F23 的子代經大量種植後發現，其維管束密度增加與 T-DNA 之插入效應無關，因為，F23 分離的野生型子代也產生高維管束密度之情形，而這些植株並無其他 T-DNA 之存在，所以，可能屬於一種自體突變 (somaclonal mutation)之現象（圖六 A, B）。此外，F23 亦屬一高分蘗的植株，且其分蘗數只有在同質品系的植株中大量增加，約較野生型 TNG67 增加 49%（圖六 A, B），有可能是屬於基因受 T-DNA 插入 knock out 所造成。由其 T-DNA 插入點兩側之基因分佈情形，T-DNA 插入於一個 putative ankyrin 基因的動子區域（圖七），可能因此影響此基因之調控，而改變分蘗之發育，將需要進一步之 RNA 分析結果驗證之。

A

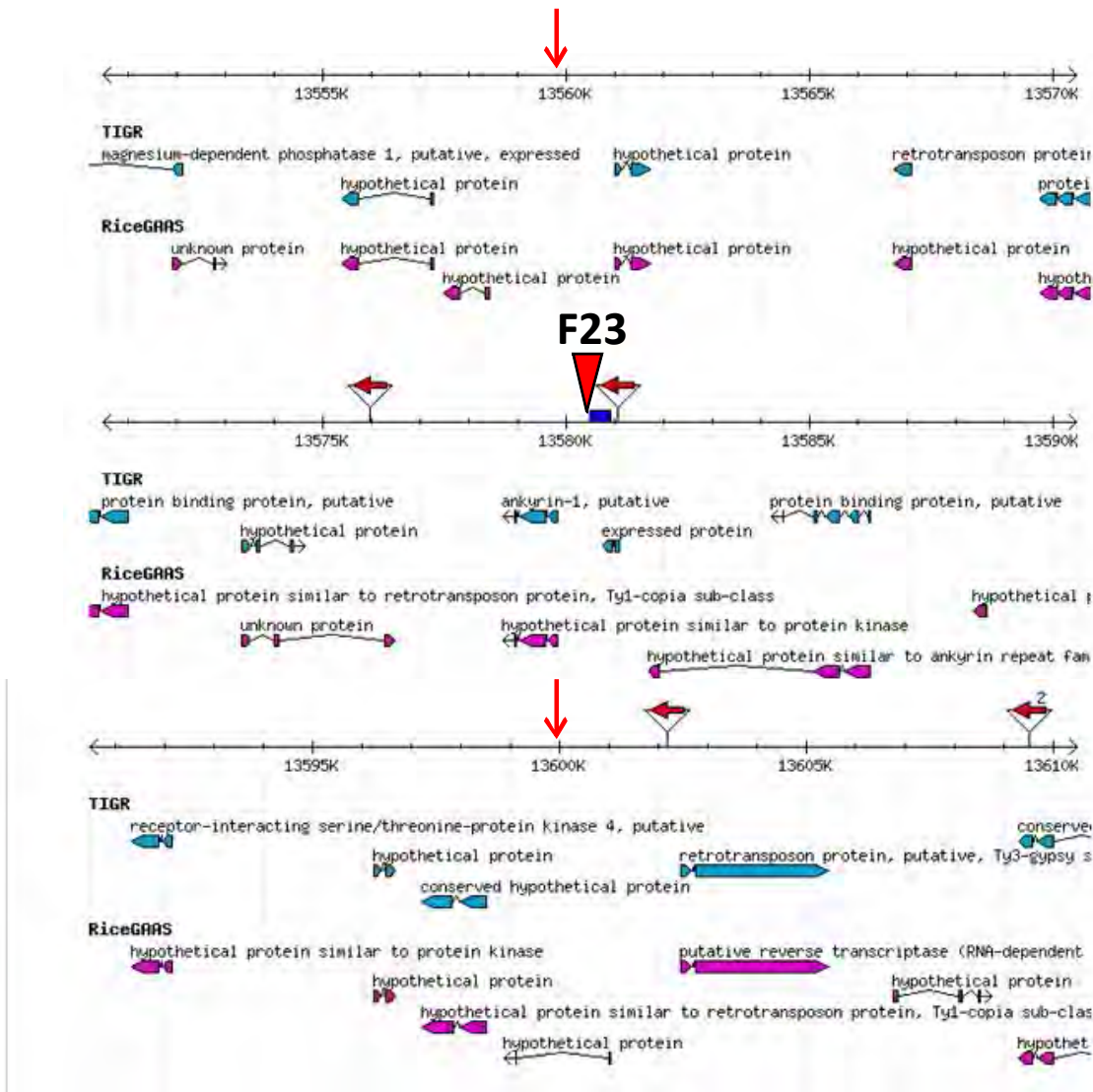


B

	OK	F23-Wt	F23-He	F23-Hb
Plant height (cm)	101.9 ± 5.0	105.5 ± 0.7	102.8 ± 3.3	101.4 ± 4.2
Tiller no.	125 ± 4.3	125 ± 2.1	11.9 ± 3.2	186 ± 5.9
Leaf width (mm)	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.2	1.1 ± 0.2
Vein no. in 2mm	9.3 ± 0.7	10.0 ± 0.0	9.5 ± 0.5	9.0 ± 0.6

圖六 觀察 F23 突變株可發現其分蘖數較高，並且與 T-DNA 插入與否呈現高度相關
圖 A 成熟植株之照片(播種後 120 日)與不同基因型植株下位葉之維管束。

圖 B 突變株 F23 表現型之生長數據，葉片生長數據以下位葉為樣本進行測量。



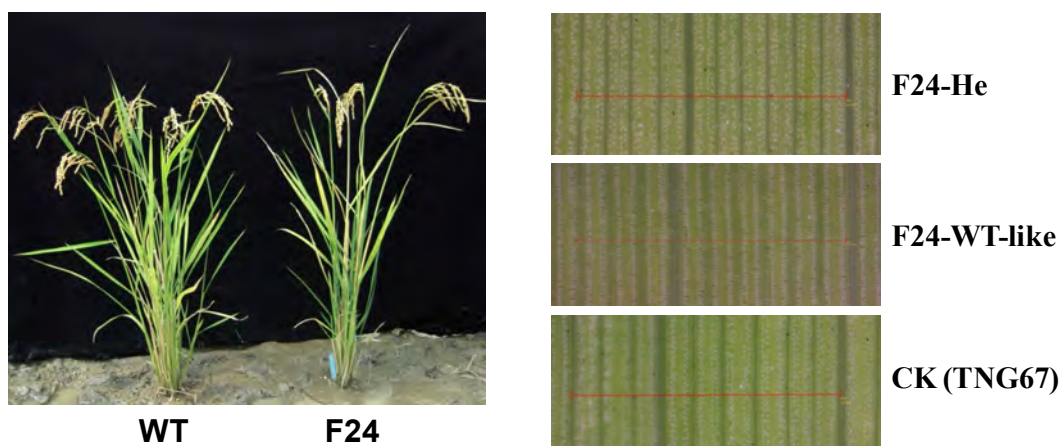
圖七 突變株 F23 之 T-DNA 插入位置兩側的基因分布，此圖由 TRIM 資料庫製作。

(三)F24 為一高維管束密度之突變株，且其維管束密度之增加與 T-DNA 之插入呈密切相關性：

F24 為一高維管束密度之突變株，且其維管束密度之增加與 T-DNA 之插入呈密切相關性，顯然是由 T-DNA 插入所造成 (圖八 A, B)，也證實透過篩選較高維管束密度的水稻突變體，找出成功插入 T-DNA 之突變體，在未來為一可採行的方法。雖然，維管束增加的數量不高，只有約較 F24 所分離的野生型增加 10% (圖八 B)，但不會使植株之生長發育受到嚴重阻礙，其分蘖與株高均屬正常，在 C₃-C₄ 作物改良及轉換過程中，應屬於一個較有利的現象，評估其 T-DNA 插入點兩側之基因分佈，有與 GA 訊息傳遞調節有關之 putative DELLA protein 外，還有數個 putative peptide transporter (PTR2) 基因 (圖九)。進一步以 RT-PCR 方式，偵測 T-DNA 插入點兩側基因表現量的變化發現，兩個 PTR2 基因在突變株 F24 中，均受 T-DNA 的插入而增加其表現量，不論是在葉片中或發育中之稻穗，其表現量均明顯的較野生型之 TNG67 高 (圖十)，其餘鄰近插入點的基因仍待進一步之偵測中。

目前水稻中已被發表的 peptide transporter 基因共有八個，其參與廣泛的水稻發育與逆境反應之調節 (Ouyang, et al., 2010)，參與維管束中氮的運輸，甚而參與種子發芽期間氮源之提供 (West et.al., 1998)。透過 T-DNA 的插入，有機會使插入點兩側之 putative peptide transporter 基因活化，不僅將有效提升種子中氮的利用效率，更可促進幼葉的生長速率，並增加根毛的數量而有助於水分的吸收。

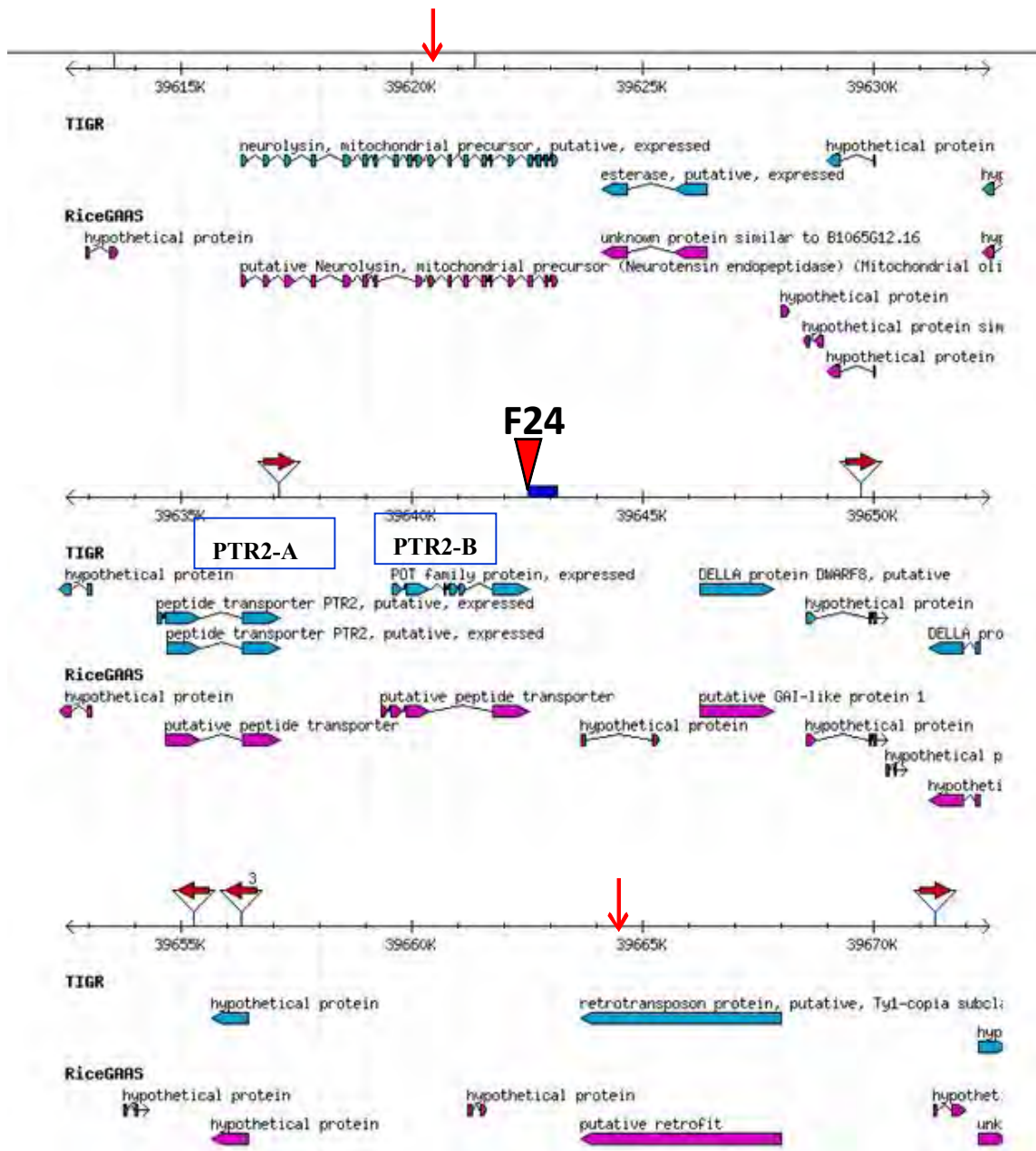
A



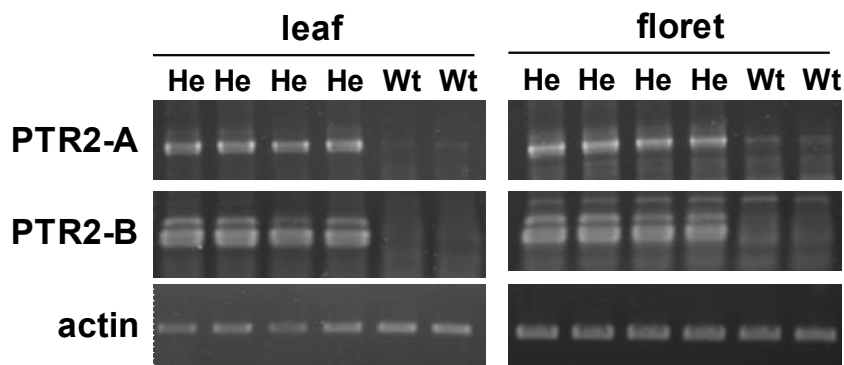
B

	CK		F24-Wt		F24-He	
Plant height (cm)	101.9	± 5.0	86.6	± 3.0	94.8	± 10.2
Tiller no.	12.5	± 4.3	14.6	± 5.2	14.7	± 6.2
Leaf width (mm)	1.2	± 0.1	1.1	± 0.1	1.1	± 0.2
Vein no. in 2 mm	9.3	± 0.7	9.1	± 0.2	10.0	± 0.7

圖八 觀察突變株 F24 可發現其維管束密度較高，並與 T-DNA 插入與否呈高度相關性
 圖 A 成熟植株之照片(播種後 120 日)與不同基因型植株下位葉之維管束。
 圖 B 突變株 F23 表現型之生長數據，葉片生長數據以下位葉為樣本進行測量。



圖九 突變株 F24 之 T-DNA 插入位置兩側的基因分布，此圖由 TRIM 資料庫製作。



圖十 突變株 F24 受 T-DNA 插入而活化其鄰近之兩個 PTR2 基因

在植物體中，我們也發現 putative peptide transporter 基因有被複製到許多不同染色體的現象，更可顯示此類基因之重要地位。藉由提升植物體中氮的利用效率，我們得以減少化學肥料的使用，降低農業的生產成本，減少對環境的污染；另一方面，氣候異常現象日益加劇，較乾燥的地區未來發生乾旱的機率恐不減反增，透過增加根毛的數量，將有助於植物水分的吸收，有效幫助植物抵抗乾燥逆境。因此，如何促進與調節此類基因的表現量，在未來深具研究潛力。

柒、結論

2011 年 10 月底，全球人口正式突破 70 億大關。糧食不足的問題將成為未來無可避免的困境。過去三年，全球糧食作物的價格平均上漲 83%，儲備量更降到 1980 年以來的最低水準。糧價節節攀升已成為不可違逆的趨勢，「有錢也買不到糧食」的惡夢隨時可能席捲全球，70% 糧食仰賴進口的台灣面對這個迫切危機，應著手研究提高糧食的自足率，但台灣的農地面積有限，風災頻仍，想提高作物的產量，就必須改良作物抗逆境的能力。

本研究利用 TRIM database 中大量的 T-DNA 插入突變株進行篩選高維管束密度之突變株，分析其 T-DNA 插入點及鄰近基因表現受 T-DNA 影響之情形，並進而利用互補試驗以驗證標的基因之功能，找出可能改變或調控維管束發育相關之基因。

在研究中發現 F1 及 F24 兩個突變株系的維管束密度增加，尤其是 F1 之維管束密度增加更為明顯，但卻由於株高過矮、分蘗數太高及葉長、葉寬減小，如 Khush 等人所提出之觀點（Khush 1995），營養組織消耗過多的養分，導致產量明顯降低。但 F1 突變株的株高則較為矮小，可減少颱風、洪水來臨時，植物仆倒死亡的機會，可能具有較強的耐逆境能力。如果以強度較弱或特定部位表現之啟動子調控標的基因之表現，也許能達到適度掌控此一基因之表現量與部位，使維管束密度增加而不會降低其產量。此外，F24 略微增加維管束密度而沒有明顯影響植株之生長發育，但也沒有增加產量；可能也顯示，使得植株葉片構形接近 C4 模式外，也需要導入促使 C4 光合作用之主要酵素基因，才能使得整個光合作用效率提升，而達到高產水稻之培育目標。

F23 之植株雖然其維管束密度雖然沒有增加，但其分蘗數卻明顯較野生種為高，有利於增加光合作用之面積，因此可預測其光合作用效率有機會較野生型為高，而增加產量，有待將來進一步之試驗證明之。

總而言之，這些 T-DNA 插入之突變株系，已成功導致水稻表型更接近 C4 植物。也呈現另一群鮮為 C4 研究者所探討的基因，也可能扮演調控維管束發育及葉片構形變化之功能。因此，一方面我們可以改用具有組織專一性的啟動子，以針對基因於植物中之表現部位加以控制與改良；另一方面則可進一步找出促進光合作用相關酵素功能的基因，以期未來在更多基因共同相輔相成下，能產生更高產量的水稻突變株，以解決未來之糧食問題。

捌、參考資料及其他

- Brown, N.J., Parsley, K., and Hibberd, J.M. (2005). The future of C4 research--maize, Flaveria or Cleome? *Trends Plant Sci* 10, 215-221.
- Brutnell T. P., Wang, L. Swartwood, K, Goldschmidt A., Jackson D., Zhu, X.-G., Kellogg, E., and Van Eck J. (2010) *Setaria viridis*: A Model for C4 Photosynthesis. *The Plant Cell*. 22, 2537-2544.
- Chuang, C.F., and Meyerowitz, E.M. (2000). Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 4985-4990.
- Jung, K.H., Hur, J., Ryu, C.H., Choi, Y., Chung, Y.Y., Miyao, A., Hirochika, H., and An, G. (2003). Characterization of a rice chlorophyll-deficient mutant using the T-DNA gene-trap system. *Plant Cell Physiol*. 44, 463-472.
- Koncz, C., Mayerhofer, R., Koncz-Kalman, Z., Nawrath, C., Reiss, B., Redei, G.P., and Schell, J. (1990). Isolation of a gene encoding a novel chloroplast protein by T-DNA tagging in *Arabidopsis thaliana*. *Embo J*. 9, 1337-1346.
- Liu, Y.G., and Whittier, R.F. (1995). Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics* 25, 674-681.
- Ouyanga, J., Cai, Z., Xia, K, Wang, Y., Duan, J., Zhang, M. (2010) Identification and analysis of eight peptide transporter homologs in rice. *Plant Sci*. 179, 374.
- Smith, A., Coupland, G., Dolan, L., Harberd, N., Jones, J., Martin, C., Sablowski, R., and Amey, A. (2010). *Plant Biology*. NY:Garland Science.
- Terada, R., Urawa, H., Inagaki, Y., Tsugane, K., and Iida, S. (2002). Efficient gene targeting by homologous recombination in rice. *Nat. Biotechnol*. 20, 1030-1034
- Wang, L., Peterson, R. B., and Brutnell T. P. (2011) Regulatory mechanisms underlying C4 photosynthesis. *New Phytolog*. 190, 9-20.
- West, C. E., Waterworth, W. M., Stephens S. M., Smith, C. P. Smith and Bray, C. M. (1998) Cloning and functional characterisation of a peptide transporter expressed in the scutellum of barley grain during the early stages of germination. *The Plant J*. 15, 221-229.
- Winkler, R.G., Frank, M.R., Galbraith, D.W., Feyereisen, R., and Feldmann, K.A. (1998). Systematic reverse genetics of transfer-DNA-tagged lines of *Arabidopsis*. Isolation of mutations in the cytochrome p450 gene superfamily. *Plant Physiol*. 118, 743-750.
- Xie, K. Wu, C., and Xiong, L. (2006) Genomic organization, differential expression, and interaction of SQUAMOSA promoter-binding-like transcription factors and microRNA156 in Rice. *Plant Physiol*. 142, 280-293.

【評語】 040719

1. 擬藉由增加水稻維管束密度，改造葉片結構使其更趨近 C4 模式。
2. F1 維管束密度雖高，但是其產量並沒有增加，是其美中不足，建議再找尋其他 mutant，使其維管束密度高，其產量也增加之品系。