

中華民國第 56 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組 植物學科

第三名

052101

尋找影響水稻分蘖數的關鍵基因

學校名稱：國立臺中第一高級中學

作者： 高二 陳坤儀 高二 林憶儒	指導老師： 朱秋欣
-------------------------	--------------

關鍵詞：水稻分蘖、T-DNA、基因轉殖

摘要

全球人口正迅速成長，但糧食並沒有增加，且暖化造成的異常氣候可能影響水稻發育，導致糧食危機。因此，若能尋找調控水稻產量之相關基因，將有助於增加稻米產量。本研究從臺灣水稻 T-DNA 插入突變體庫中，發現一個多分蘖的水稻突變株 M69217，若能找到調控其多分蘖性狀之基因，具有增加稻米產量之潛力。首先，利用基因型分析，比較植株基因型與外表型的關聯。接著，找尋受 T-DNA 插入影響的基因，進一步推論出是哪個（些）基因造成高分蘖的現象。未來，我們希望運用基因轉殖，來確認哪個（些）基因可重現 M69217 的高分蘖性狀，並深入了解這些基因如何控制分蘖生長的詳細機制，期許這項研究能對水稻產量之提升作出貢獻。

壹、研究動機

一、 水稻之重要性及其相關研究

水稻、小麥和玉米為世界三大主要的穀類作物，提供全球超過 60% 的人們每日所須之能量，其中在 2012 年時，此三種作物的年產值更高達二十二億八千五百萬噸，佔全球十大主要作物產值的 66%，足見三者在全球糧食供應上的重要性。而其中水稻對全球超過 16 億的人口來說是不可或缺的生活主食，這些人口主要分布於亞洲、拉丁美洲和非洲，所以對大陸、日本、台灣等地區，水稻對已是不可或缺的糧食作物。

有鑑於水稻的重要性，日本於 1998 年主導國際水稻基因體定序計畫，此計畫聯合我國、日本、南韓、英國、加拿大、美國、巴西、印度、法國與中國等十國參與，期望透過得到完整的水稻基因體序列，了解更詳細的水稻基因功能，並希望這些成果能應用於未來的水稻改良上。水稻基因體於 2005 年完成定序，結果顯示水稻基因體大小為三億九千萬鹼基對，是人類基因體的八分之一，但在水稻基因體中卻編碼約三萬七千個基因，比人類所擁有的基因還多。從目前的研究資料可得知，以水稻作為禾本科模式植物進行研究主要有四項好處，分別為（一）水稻基因體是禾本科作物中最小的；（二）水稻經多年的研究及遺傳特性之研究最完整；（三）水稻的基因轉殖技術已經建立；（四）水稻和其他重要農作物如禾本科的基因在

染色體上的排列順序極相似，故由水稻基因體分析的結果將可應用到其他重要作物，例如；玉米、小麥等方面。

在二十一世紀初的今日，植物學家面臨著很嚴苛的挑戰：在未來幾十年內，世界人口將倍增，而以目前的科技，糧食的產量又不易增加到相對的數量；同時，為達到生態保育與永續經營的目的，肥料、農藥、殺草劑的施用量又必須減少，因此，科學家們對於作物中控制抗病、抗蟲、耐旱、耐鹽、耐寒、生長、產量及品質等等性狀的基因及其功能，均需要有更多的探討。基因體分析的最終目的在瞭解各有用基因的結構與功能，隨著水稻基因體定序的完成，目前水稻的研究已進入後基因體生物學的時代，如何加速相關研究工作，針對水稻全部的基因之構造與功能進行深入的了解，並利用這些研究成果，嘗試改良水稻或其他禾本科作物，藉此克服前述的挑戰，將是未來此項研究的重要課題。

二、 水稻產量改良及高分蘗 T-DNA 突變體 M69217 之相關研究

水稻的產量主要由多項結構因素所影響，包含水稻根部對養分的吸收，光合作用的效率，種子的大小，稻穗的分枝多寡以及水稻分蘗數等，皆可能對水稻整體的種子產量造成影響。從過去的研究已經知道多個水稻基因能夠調控上述因子進而影響水稻的產量，例如DEEPER ROOTING 1 (DRO1)為已知能夠影響水稻根部生長角度，藉此控制根部對養分的吸收，影響水稻的產量 (Uga et al., 2015)；Big Grain1 (BG1)和Big Grain2 (BG2)能夠有效的控制種子的大小，隨著BG1或BG2表現量的增加，可以有效的增加種子的大小 (Liu et al., 2015)；SQUAMOSA promoter binding protein like (SPL)在水稻中扮演著調控稻穗分枝多寡的重要角色，其中OsSPL14可提高稻穗的分枝，使單一稻穗所得到的種子數目增加 (Miura et al., 2010)；而水稻的分蘗數則有相當多的研究探討，包含MONOCULM 1 (MOC1)以及miR156等基因 (Xie et al., 2006)，當上述基因表現量增加時，將會大大的增加水稻分蘗的產生，也因此若能夠有效探討上述能影響產量的因素是受到什麼樣的基因所調控，並進一步嘗試運用於水稻的品種改良上，或許有機會能夠幫助提升水稻的產量。

為了探討水稻基因功能，利用農桿菌 Ti 質體內之 T-DNA 會隨機插入水稻基因體的各個部位的特性，中央研究院與農試所共同建立了一個台灣水稻 T-DNA 插入的突變體庫 (Taiwan

Rice Insertional Mutants (TRIM) database)，研究人員可以藉由 TRIM 水稻突變體庫所提供之水稻 T-DNA 突變體資料，進行功能基因組之研究，或找尋產生特異性狀的突變株，進行目標基因功能的探討。因為 TRIM 水稻突變體庫所使用的 T-DNA 具有四個 35S 增強子，所以當 T-DNA 插入時，可能造成鄰近基因活化，或插入基因中，導致插入之基因功能缺失，可作為基因功能分析之材料。目前國內透過這些基因缺失或基因活化的水稻突變株，已經成功發表多篇文獻 (Hsing et al., 2007; Lo et al., 2008; Kanjanaphachot et al., 2012)，足見此研究方法在水稻基因功能的研究上提供相當大的便利性。

本研究由 TRIM 水稻突變體庫中，發現一個多分蘖的水稻突變株 M69217 (圖一)，具有多分蘖、晚開花及株高矮等性狀，推測是因 T-DNA 插入而造成的。這些外表性狀中，多分蘖是本研究觀察的重點，也是我們挑選它作為本研究對象的主因。在其他條件不變的情況下，若水稻的分蘖數越多，其產生的稻穗便越多，而能夠產生更多稻米，提升水稻總產量。



圖一、突變株外表性狀比較

為了探究為何水稻突變株 M69217 會具有高分蘖的現象，在實驗室前人研究中，針對水稻突變株 M69217 進行質體救援技術 (Plasmid Rescue) 得知有一 T-DNA 插入水稻第二號染色體，編號為 BAC : OJ1297_C09 之 36,560bp 位置。為了瞭解此高分蘖性狀是否確實為此 T-DNA 插入所造成，本研究，首先分析突變株 M69217 之子代基因型與外表型的關聯，藉由觀察突變株 M69217 之子代基因型與外表型的關聯，將可證實 M69217 的特異外表性狀，是否由此 T-DNA 插入所造成，接著本研究將針對此 T-DNA 插入位鄰近的基因訊息進行調查，觀察有多





少基因可能會受到此 T-DNA 插入破壞或活化，並利用 RT-PCR 調查 T-DNA 插入位鄰近基因表現，找出基因表現受此 T-DNA 插入所影響的基因，藉此，進一步探討可能和 M69217 外表性狀有所關聯的基因。上述研究策略即是本研究計畫，找尋調控水稻分蘖數關鍵基因的方法，而在未來研究中，我們也會嘗試構築各基因型轉殖株，以深入探討調控水稻分蘖數的詳細作用機制。




貳、研究目的

- 一、 透過 PCR 進行基因型分析，觀察外表型和基因型間是否有連結。
- 二、 收集 T-DNA 鄰近的基因分布情形及基因資料，並分析找尋表現受 T-DNA 影響的基因。

參、研究設備及器材

- 一、 各項重要實驗器材

	
PCR machine	pipette
	

電泳槽	Agarose I™
	
UV 影像系統 (High Performance Transilluminator)	16 管震盪式微珠研磨器
	
DNA/RNA 用分光光譜儀	

二、 藥品

(一) PCR

藥品：GoTaq® Flexi DNA Polymerase (公司型號：Promega M8295)、DreamTaq™DNA Polymerase (公司型號：Fermentas EP0702)。

(二) 跑膠及照膠

藥品：agarose、EtBr、退染劑。

(三) DNA 及 RNA 萃取

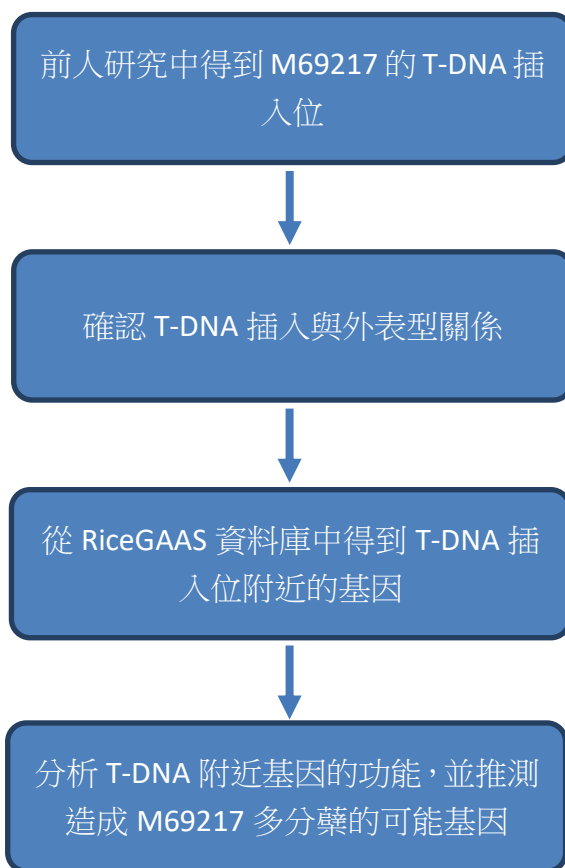
藥品：CTAB extraction buffer、chloroform、液態氮、100% Ethanol、75% Ethanol、RNase。

(四) RT-PCR

藥品：Template RNA、Oligo dT primer、20% Reaction Buffer、RNA 抑制劑 (RiboLock RNase Inhibitor)、10 Mm dNTP、反轉錄酶 (RevertAid Reverse-Transcriptase)。

肆、研究過程或方法

研究策略如下：



一、透過 PCR 進行基因型分析，觀察 M69217 之外表型和基因型間是否有連結。

利用 TRIM 資料庫，找到一水稻突變體 M69217，因其具有 T-DNA 插入，表現出別於野生型的特殊外表性狀（株矮、多分蘖、晚開花等），其中多分蘖為本研究重點。為了解造成此特殊性狀（多分蘖）之基因，本研究將 M69217 作為實驗對象。

(一) 利用 PCR 進行基因型分析，比較田間植株外表型與基因型的關係。

實驗步驟：

1. 播種：將水稻種子脫去外殼，清洗後分別置於含抗生素的培養基上。
2. 置於生長箱後一段時間後，再移至田間種植。
3. 至田間採樣挑選 M69217 的 24 株植株。
4. 萃取 24 株植株的 DNA。

DNA 萃取步驟

(1) 準備 1.5ml 的 tube，將玻璃珠及水稻葉片放入 tube，放在液態氮中。再將 tube

置入震盪式微珠研磨器打碎葉片，接著放在液態氮中。

- (2) 加入 700 μ l CTAB extraction buffer 至 tube 中，vortex，置入 60 $^{\circ}$ C 乾浴槽作用 30 分鐘。
之後，加入 chloroform 700 μ l 到 tube 中，vortex，離心 10 分鐘 (12000 rpm)。
- (3) 取離心後的上清液，加入 1 升 100% Ethanol，於 -20 $^{\circ}$ C 環境中沉澱 20 分鐘。再離心 20 分鐘 (12000 rpm) 後，倒掉上清液，加入 1000 μ l 75% Ethanol，離心 5 分鐘，倒掉上清液。之後，將離心機接上抽真空機離心 1 分鐘 (12000 rpm)。
- (4) 混合 1320 μ l H₂O 和 132 μ l RNase 後，將每一管 tube 加入 20 μ l 混合液。
- (5) 低速離心後，置入 37 $^{\circ}$ C 乾浴機 30 分鐘。

5. 利用 PCR 進行基因型分析。

(1) PCR 步驟

設計引子及 PCR program，將適量藥品及 DNA 混成溶液後，放入 PCR machine。

PCR program (阿拉伯數字表反應步驟)

<MS-2>

- A. 95 $^{\circ}$ C 反應 5 分鐘
- B. 95 $^{\circ}$ C 反應 1 分鐘
- C. 53 $^{\circ}$ C 反應 1 分鐘
- D. 72 $^{\circ}$ C 反應 1 分鐘
- E. 回到步驟 2 反應 29 分鐘
- F. 72 $^{\circ}$ C 反應 10 分鐘
- G. 4 $^{\circ}$ C 保存

(2) 凝膠電泳步驟

- A. 利用 agarose 配成濃度 1.2% 的電泳膠。之後，將 PCR 後的 DNA 加入染劑，置入電泳膠的孔洞中。將電泳槽通電約 30 分鐘。
- B. 將電泳膠泡在 EtBr 中約 60~90 秒。之後，浸入退染液中進行退染。
- C. 將電泳膠放在紫外光下，並用電腦拍照記錄。

(3) 基因型分析

依照 PCR 結果，對 24 植株進行基因型分析，並比較外表型與基因型關係。

二、分析 T-DNA copy 數，確認是否有可能為其他 T-DNA 造成 M69217 之外表特性。

(一) 利用南方墨點法確認 T-DNA 插入數目

實驗步驟

1. 利用凝膠電泳將從 M69217 萃取出 DNA 依分子大小進行分離。
2. 跑膠後，將硝基纖維素膜至於電泳膠上，轉印 DNA 至硝基纖維素膜。
3. 將硝基纖維素膜浸泡在含 DNA 引子的溶液中，接著 DNA 引子會和 T-DNA 互補結合。最後置於 X 光下，即可觀察到 T-DNA 數目。

三、收集 T-DNA 鄰近的基因分布情形及基因資料，並透過分析找尋表現受 T-DNA 影響的基因。

利用 NCBI 可得 T-DNA 可能的鄰近基因分布，接著我們進行 RT-PCR 進行確認。

(一) RNA 萃取

在進行 RT-PCR 之前，我們需要先萃取 M69217 的 RNA。

實驗步驟：

RNA 萃取步驟

1. 取適量葉片，加入液態氮，快速研磨成粉末，取 0.75 到 1ml 的量到 2ml eppendorf。接著立刻加入 1ml Trizol，vortex 後置冰 10 分鐘。加入 200 μ l chloroform (於抽氣櫃內操作)，vortex，室溫下靜置 3 分鐘。
2. 4 $^{\circ}$ C 離心 15 分鐘，12000rpm。取 600 μ l 上清液到新 1.5ml eppendorf，加入 800 μ l isopropanol 混勻，室溫下靜置 10 分鐘。之後，在 4 $^{\circ}$ C 離心 10 分鐘，12000rpm。接著去上清液，並以 pipette 吸乾。再加入 1ml 75%DEPC EtOH，vortex，使沉澱物懸浮。4 $^{\circ}$ C 離心 5 分鐘 (7500rpm)後，去上清液，並以 pipette 吸乾。
3. 視沉澱物多寡加入 30 到 50 μ l DEPC H₂O，置於 65 $^{\circ}$ C，10 分鐘，回溶沉澱物。4 $^{\circ}$ C 離心 5 分鐘，12000rpm。接著取 40 μ l 上清液到新的 1.5ml eppendorf。
4. RNase-free DNase treat: 取 RNA 40 μ l、reaction buffer 4 μ l 與 DNase 4 μ l 加入 1.5 ml eppendorf，置於 37 $^{\circ}$ C，30 分鐘。
5. 加 4 μ l EDTA (stop buffer)，置於 65 $^{\circ}$ C，10 分鐘。再加入 1ml 100% DEPC EtOH，置於 -20 $^{\circ}$ C，20 分鐘。

6. 重複步驟 5 後，進行 RNA 定量，並放入 -80°C 冰箱保存。

(二) RT-PCR

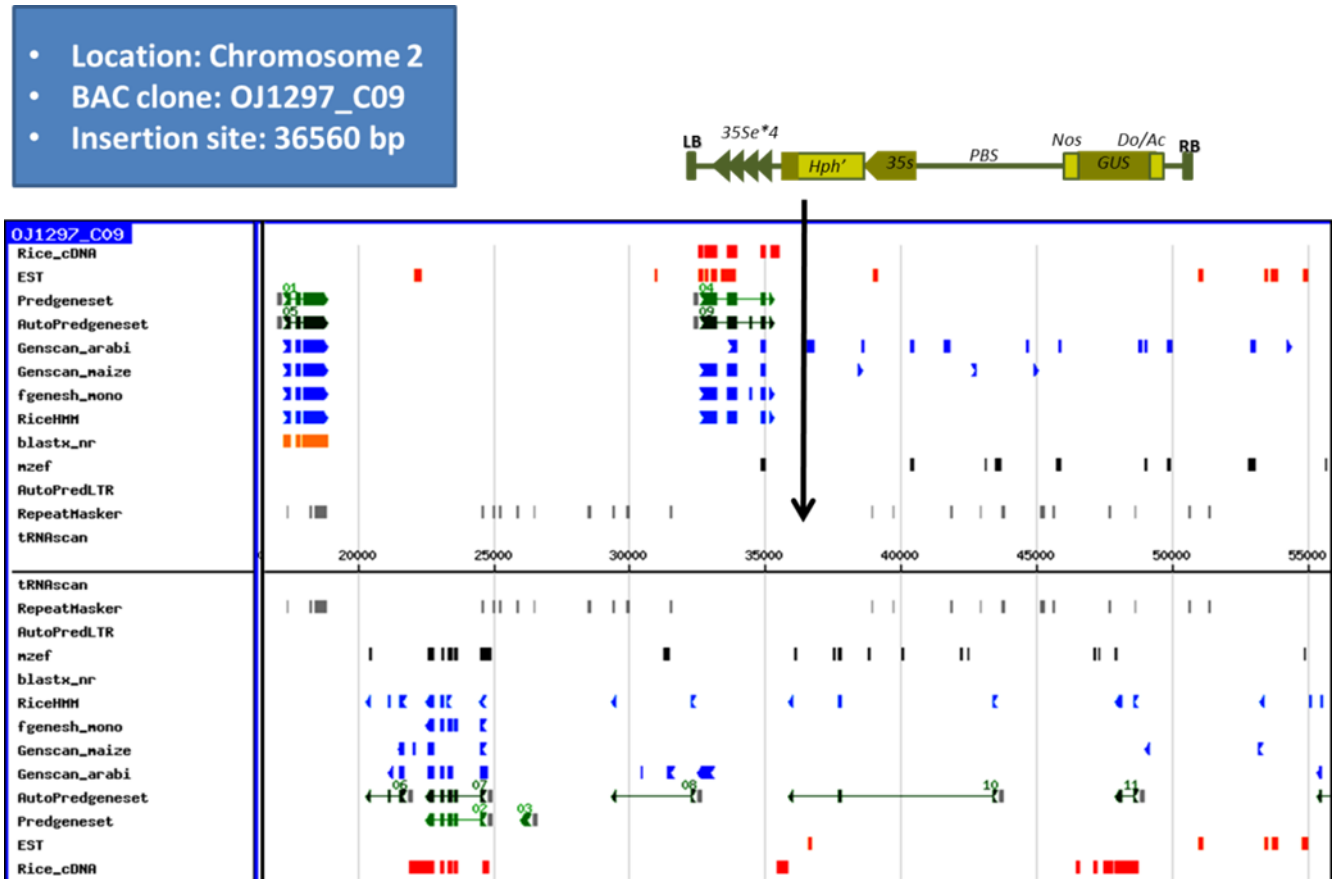
實驗步驟：

1. 將從 M69217 萃取出 RNA 取 5 μ g 加入 Oligo dT primer 1~5 μ l，然後加 DEPC water 至 12 μ l。
置於 65°C，5 分鐘後，於 4°C 反應至少 1 分鐘。
2. 加入 20% Reaction Buffer 4 μ l、RiboLock RNase Inhibitor 1 μ l、10mM dNTP 2 μ l，以及 RevertAid Reverse-Transcriptase 1 μ l，最後溶液總體積為 20 μ l。
3. 置於 42°C，60 分鐘（若 RNA 模板有高含量的 GC 鹼基，可將溫度提高至 45°C 反應 60 分鐘）。
最後 70°C 反應 5 分鐘，完成 RT 反應。
4. 依照前述 PCR 步驟，進行 PCR 反應。

伍、研究結果

一、 M69217 之 T-DNA 插入位分析

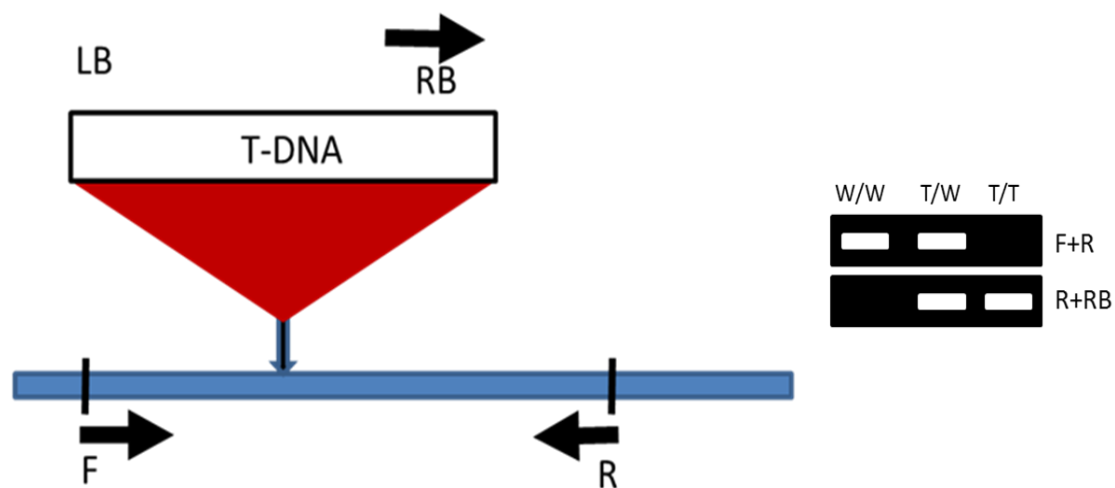
由前人實驗所得之 T-DNA 鄰近序列資訊比對 Rice GAAS 資料庫，本研究所探討 M69217 之 T-DNA 插入位於水稻第二號染色體 BAC: OJ1297_C09 之 36,560bp 的位置（圖二）。此 T-DNA 並無插入到任何基因內，所以沒有破壞任何基因。另外，T-DNA 上帶有四個 CaMV35S 增強子，能活化插入位鄰近基因，預期能使其鄰近基因表現量增加，而造成性狀。



圖二、M69217之T-DNA插入位分析

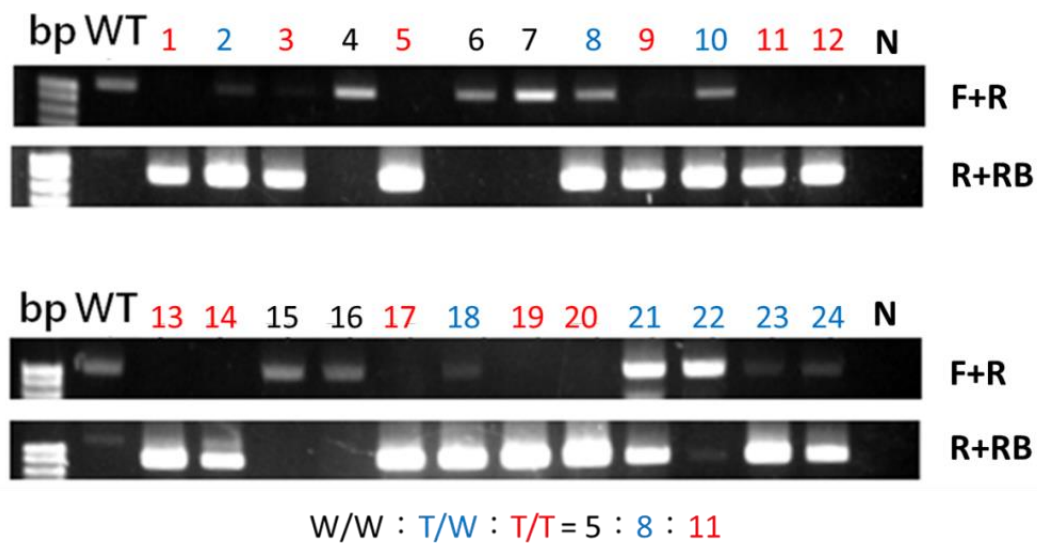
二、 M69217 基因型之分析

為了探究 M69217 外表型與基因型之間是否有關聯，本實驗嘗試針對 M69217 進行基因型分析，於 T-DNA 插入位上下游設計引子（命名為 **F** 及 **R**），並搭配 T-DNA 上 RB（Right border）序列所設計的引子進行 PCR 分析（圖三）。倘若該位置並無 T-DNA 插入的話，可以藉由 **F+R** 成功獲得 PCR 產物之訊號，然而若 T-DNA 存在於該位置時，則可藉由 **R+RB** 的引子組合獲得 PCR 產物的訊號。因此，若只獲得 **F+R** 或是 **R+RB** 的 PCR 產物訊號時，該植株之基因型則分別為野生型（W/W, wild-type like）與同質基因型（T/T, homozygous），而兩訊號皆存在時基因型為異質基因型（T/W, heterozygous）（圖三）。



圖三、M69217基因型分析引子示意圖

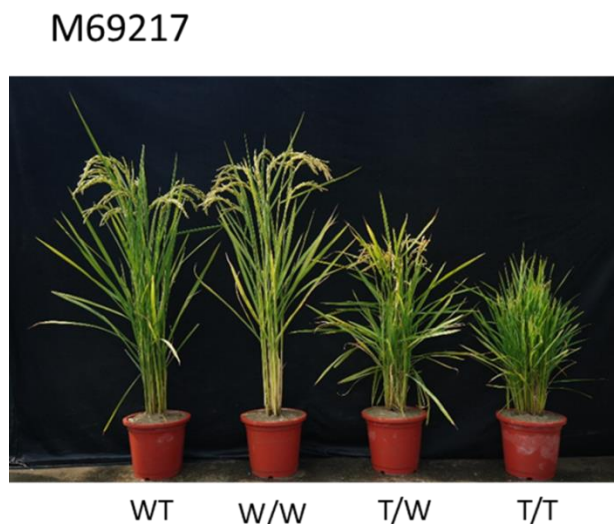
突變株子代之基因型分析結果，顯示在此 24 個植株中，基因型為 W/W 的植株有 5 株，T/W 有 8 株，T/T 則有 11 株（圖四）。然而依照孟德爾所提出的遺傳定律，異質基因型 (T/W) 自交之後，理論上將會得到 W/W : T/W : T/T = 1 : 2 : 1。這是因為水稻減數分裂時，孟德爾所提出的獨立分配律及自由結合律所造成的結果。但我們的結果顯示這並不符合孟德爾所提出的遺傳定律，推測這是因為我們取的樣本數不夠大，若是增加樣本母體數，得到的結果就有較高機率會接近 W/W : T/W : T/T = 1 : 2 : 1 的比例。



圖四、M69217基因型分析結果

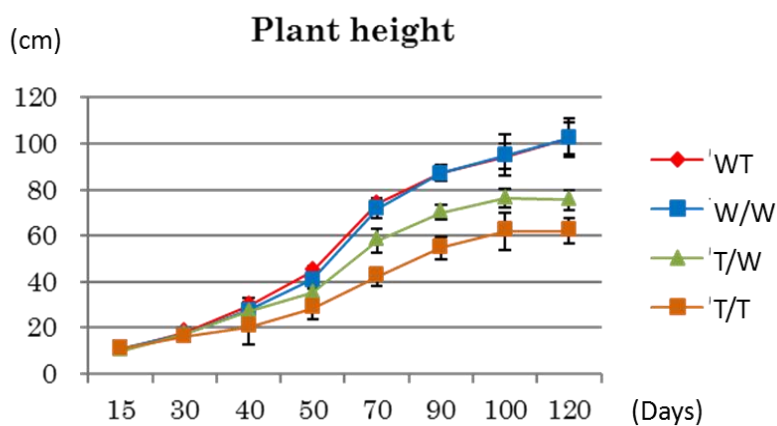
三、 外表型和基因型關聯性調查結果

本研究進行突變株後代表型與基因型關聯性調查，根據植株不同基因型和 WT 相比，可從外表看出，隨著基因型從 W/W、T/W 到 T/T 的改變，植株外表也有著明顯的變化：呈現株高漸矮、水稻分蘗數漸多、葉片長度漸短的趨勢（圖五）。



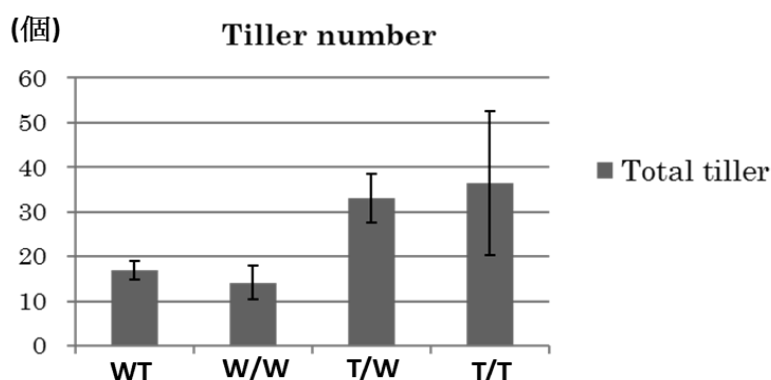
圖五、水稻野生型 (WT) 與 M69217 分離後代不同基因型植株之外表性狀比較

在株高方面，M69217 分離後代不同基因型植株在各生長階段中，WT 與 W/W 高度大致維持相等，T/W 的株高則會較 WT 和 W/W 的矮，而在各基因型中 T/T 的株高保持最矮，大約是 W/W 的 75%（圖六）。



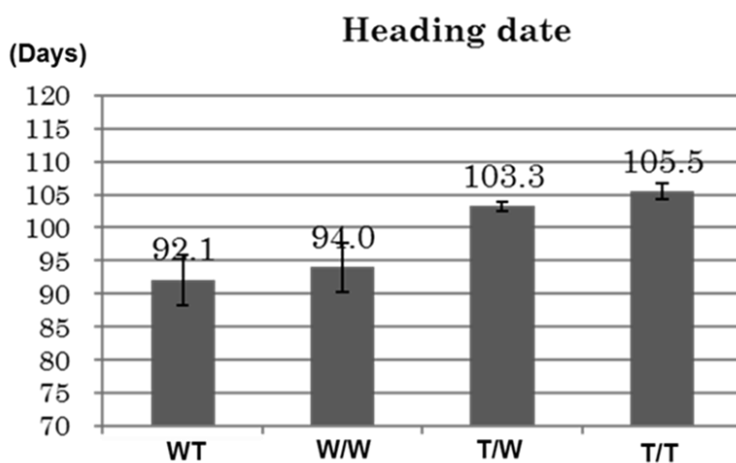
圖六、水稻野生型 (WT) 與 M69217 分離後代不同基因型植株之植株高度成長比較圖

在水稻分蘗數部分，WT 與 W/W 的分蘗數大致相等，T/T 的分蘗數則是各個基因型中最多的，而 T/W 與 T/T 的分蘗數會多於 WT 與 W/W 的分蘗數，約為 WT 與 W/W 的兩倍(圖七)。



圖七、水稻野生型 (WT) 與M69217分離後代不同基因型植株之分蘗數比較圖

在抽穗時間方面，WT 和 W/W 的抽穗時間較為相近，而 T/T 則和 T/W 的抽穗時間較為類似。四者互相比較之下，T/T 和 T/W 相較於 WT 和 W/W 約晚了十天 (圖八)。

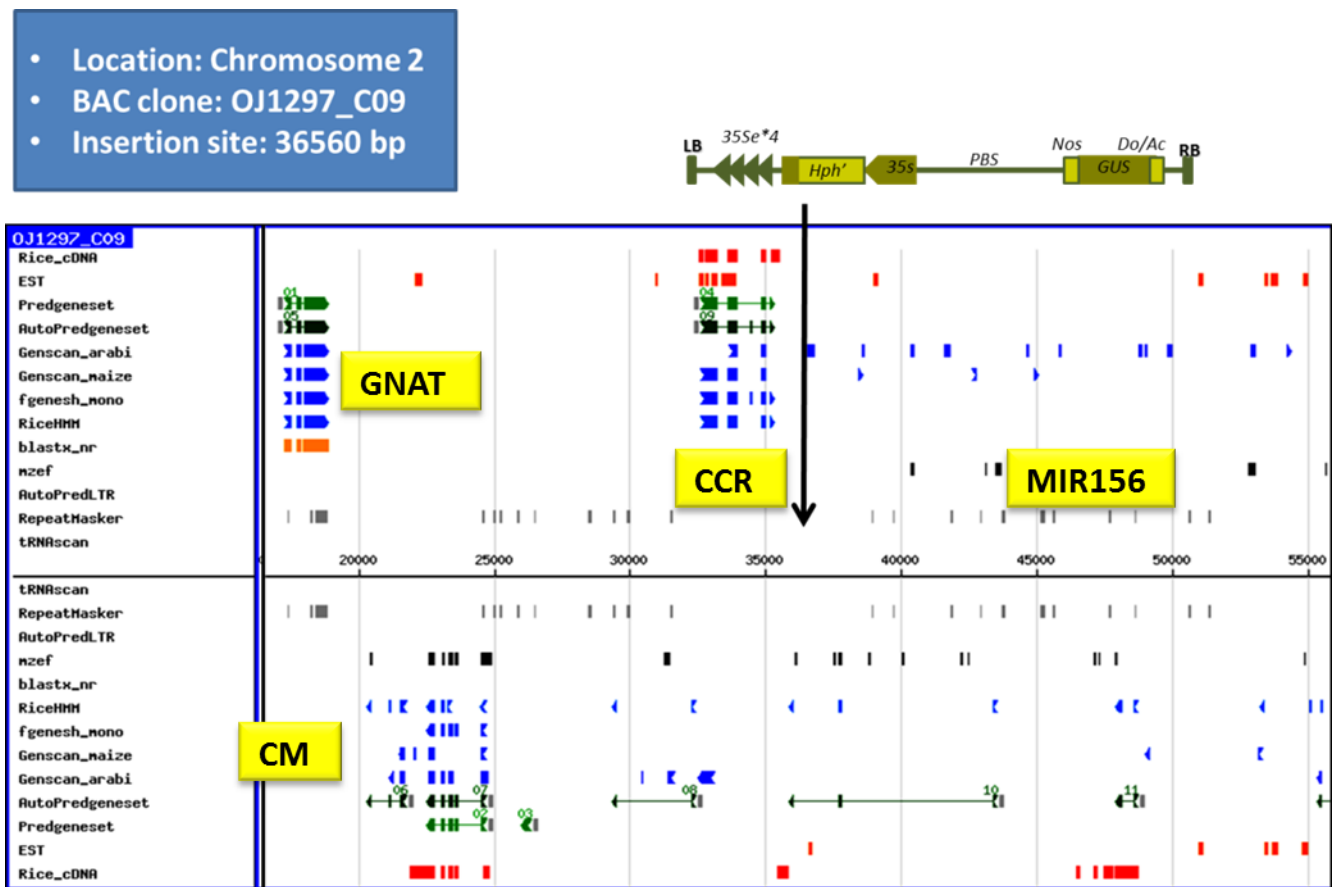


圖八、水稻野生型 (WT) 與M69217分離後代不同基因型植株之抽穗期比較圖

綜合上述結果，發現 T/T 及 T/W 可能因其有 T-DNA 插入而造成其外表性狀呈現高分蘗、晚開花、矮化等特性。另外我們發現，T/W 之性狀會介於 W/W 與 T/T 之間，而 W/W 的外表性狀則與 WT 類似。這些研究結果說明了 T-DNA 的插入對水稻外表造成多方面的影響，且植株基因型與外表型具有高度的關聯性。

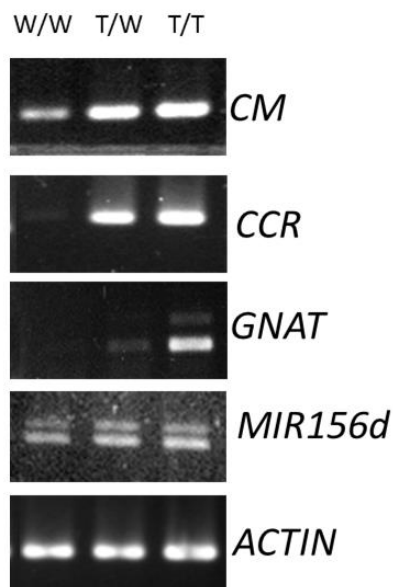
四、 T-DNA 鄰近基因資訊與表現量分析

從 Rice GAAS 得到之 T-DNA 插入位鄰近基因資訊，我們發現 T-DNA 插入位鄰近有四個基因，分別為 Chorismate mutase (CM)、Cinnamoyl-CoA reductase (CCR)、GCN5-related N-terminal acetyltransferases (GNAT) 和 microRNA156 (MIR156) (圖九)。此四個基因均沒有被 T-DNA 插入而破壞，但可能受到 T-DNA 上的增強子活化而增加基因的表現。為了進一步確認鄰近基因是否被活化，進而造成性狀，我們進行了基因表現量分析。



圖九、T-DNA插入位鄰近基因資訊

本研究利用 RT-PCR 進行表現量分析，其中肌動蛋白 (Actin)作為 RNA 品質及穩定性之對照組。我們發現 CM 在各種基因型中皆有表現，但在 W/W 中表現較弱；CCR 除了在 W/W 中沒有表現外，其餘基因型皆有表現；GNAT 則在 T/T 及 T/W 中有表現，但 T/W 的表現量較低；MIR156 在 W/W、T/W 和 T/T 中皆有表現，且其表現量有逐漸增高的趨勢（圖十）。綜合上述 RT-PCR 結果來探討 T-DNA 插入事件所造成 W/W、T/W 與 T/T 其鄰近基因活化的情形，在 T/W 與 T/T 中，CM、CCR 及 MIR156 皆有表現，然而 W/W 表現量較低，因此我們所探討之 T-DNA 插入與水稻的基因表現確實有關聯性。而 GNAT 在 W/W 並無表現，在 T/W 中表現量較低，在 T/T 具有高度活化的情形。總體而言，透過上述 RT-PCR 的結果，我們偵測出各基因在 T-DNA 插入位附近的表現情形，並與基因型有所關聯。於是我們推論 CM、CCR、GNAT 和 MIR156 為受 T-DNA 插入所活化之基因，並可能與多分蘖的外表性狀有關。



圖十、RT-PCR結果

陸、討論

- 一、本研究由 RiceGAAS 水稻基因體資料庫中搜尋 T-DNA 插入位鄰近的基因資訊，得知插入位附近(上、下游各約 30kb)共有四個可能被活化的基因：CM、CCR、GNAT 和 MIR156，並利用 RT-PCR 分析上述四者的表現量，與野生型相比，皆有被活化的現象。然而這四者中，究竟何者和多分蘖的外表性狀有關，將於下列分項討論。

(一) CM (Chorismate mutase)

Chorismate 可產生三種產物，分別為苯丙胺酸、酪胺酸及色胺酸。這三種胺基酸協助合成之二次代謝物及其功能分別敘述如下：苯丙胺酸為二次代謝物類苯基丙烷 (phenylpropanoid) 的前驅物。類苯基丙烷的合成會受到生物及非生物環境逆境調節，而類苯基丙烷的子群 (sub-groups) 則包括類黃酮、木質素和花青素。類黃酮在植物中能抗氧化與抵抗病原體；木質素則能支持植物結構，而花青素能形成植物色素。接著，酪胺酸為二次代謝物維生素 E (tocochromanols) 的前驅物，而維生素 E 在生物中為重要的抗氧化劑。最後，色胺酸則是吲哚乙酸 (IAA) 與吲哚類硫代配糖體 (indole glucosinolates) 的前驅物。吲哚乙酸可促進頂芽優勢，抑制側芽生長，吲哚類硫代配糖體的功能則和植物與昆蟲、植物與病原體間的互動有關 (Tzin and Galili, 2010)。在 Chorismate 產生的三種代謝物中，苯丙胺酸及酪胺酸可經由 CM 催化合成 (Eberhard et al., 1993)，因此若藉由 CM 催化提高苯丙胺酸與酪胺酸的產量，會抑制色胺酸的合成，進而減少吲哚乙酸的產量，抑制頂芽生長，而使水稻分蘖數增加。而在本研究所探討的水稻突變體 M69217 中，CM 可能受到 T-DNA 上的四個 CaMV35S 增強子活化，而使 CM 表現量增加，間接影響吲哚乙酸的產量，造成水稻分蘖數增加。綜合上述文獻探討及研究討論，我們推測活化 CM 可能造成水稻分蘖數增加。

(二) CCR (Cinnamoyl-CoA reductase)

木質素是構成細胞壁的成分之一，隨著木質化組織的形成，能使細胞壁具有堅硬、不滲透性和耐生物降解的特性。因此由木質素所組成之不透水細胞壁，可減少植物在維管束

間運輸水分和溶質時的水分散失，亦可保護植物抵抗病原體入侵 (Sarkanen and Ludwig, 1971)。木質素是由木質素單體聚合而成，在被子植物中，木質素主要由 G-木質素 (guaiacyl lignin)及 S-木質素 (syringyl lignin)組成；在裸子植物中則發現存在豐富的 H-木質素 (*p*-hydroxyphenyl lignin)，但雙子葉植物中的 H-木質素含量非常稀少 (Tu et al., 2010)。木質素單體可藉由 CCR 催化苯丙胺酸及酪胺酸形成，再聚合成木質素 (Baltas et al., 2005)，因此 CCR 為合成木質素的相關酵素。CCR 在菸草 (Piquemal et al., 1998)、阿拉伯芥 (Jones et al., 2001)、玉米 (Tamasloukht et al., 2011)等中皆有研究，科學家曾對上述三者進行研究，透過抑制 CCR 的活性來降低木質素的含量，發現上述三者在維管束結構部分皆有鬆散倒塌的現象，並在植株外表有矮化及葉片畸形等影響，然而本研究藉由 T-DNA 上四個 CaMV35S 增強子活化 CCR 基因的結果亦使水稻突變體 M69217 產生矮化及短穗的現象。此外增加 CCR 的表現量可能會促進 CM 催化合成苯丙胺酸及酪胺酸，抑制色胺酸的合成，進而減少吲哚乙酸的產量，抑制頂芽生長，而使水稻分蘗數增加。因此我們推測 M69217 矮化、短穗及多分蘗的現象與 CCR 基因的活化有關。

(三) GNAT (GCN5-related N-terminal acetyltransferases)

染色質是由組蛋白與 DNA 所組成，其中組蛋白可經由甲基化或乙醯化修飾造成染色質結構重組，影響基因表現。組蛋白乙醯化為基因表現之關鍵 (Grunstein, 1997)，乙醯基團 (acetyl group) 會修飾組蛋白 N 端，使原本帶正電荷的離胺酸成電中性，此時組蛋白與負電荷之 DNA 結合力變弱，染色質之組蛋白與 DNA 複合物結構呈現鬆散之狀態，因此使轉錄因子較容易與 DNA 結合 (Kim et al., 2010)。組蛋白的高度乙醯化會使染色質的結構變鬆散，並且通常與轉錄作用的活化有關，而低度或無乙醯化則會抑制基因表現。組蛋白乙醯化在植物細胞週期、開花時間、植物對環境條件的反應及賀爾蒙訊號等都扮演重要的角色，其穩定平衡須透過 histone acetyltransferases (HAT) 與 histone deacetylases (HDAT) 這兩種酵素互相拮抗調節。在阿拉伯芥中，HAT 分成 GNAT、MYST、P300/CBP 與 TAF1 四種類別。透過 T-DNA 插入及點突變造成的突變株，科學家近年來已研究出一些阿拉伯芥的 HAT，其中 *HAG1/AtGCN5* 為一種重要的 HAT，阿拉伯芥中的 *HAG1/AtGCN5*

突變株表現多種性狀的缺失，其表現型具有矮化、頂芽優勢喪失、異常的分生功能等。造成上述性狀的原因可能與 *AtGCN5* 依賴型組蛋白乙酰化會調控發育過程中一些關鍵調節基因的表現有關 (Servet et al., 2010)。綜合上述文獻探討，由於 *GNAT* 的突變株相較於野生型，有矮化、頂芽優勢喪失及異常的分生功能等性狀，與 *M69217* 株矮及多分蘗的性狀相似。因此我們推測 *GNAT* 的功能可能與水稻植株矮化及多分蘗有關。

(四) *MIR156* (microRNA156)

microRNA (miRNA) 是一種 non-coding RNA，此 RNA 並不會轉譯出蛋白質。最早於 1993 年在線蟲身上發現，是一群會自身摺疊的短鏈 RNA，在生物體內 miRNA 可和特定的基因之 mRNA 結合以破壞其 mRNA 或抑制轉譯作用，將會抑制特定基因的表現。而本研究所提及的 *MIR156* 即是一種 miRNA。在阿拉伯芥的研究中，發現 *MIR156* 能抑制調控花與果實發育的植物基因轉錄因子，其名為 *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN LIKE PROTEIN (SPL)* 轉錄因子 (Klein et al., 1996)，目前已知 *SPL3*、*SPL4* 及 *SPL5* 等基因表現會受 *MIR156* 抑制而延長了阿拉伯芥的生長期，並造成晚開花的現象 (Wu and Poethig, 2006)。*MIR156* 在水稻研究方面，*osa-MIR156* 在水稻基因體中總共有 12 個成員，分別為 *osa-MIR156a~j* 及 *osa-MIR156l*。Xie 等人研究中曾提及 *MIR156* 參與水稻分蘗數之生成 (Xie et al., 2006)，當 *osa-MIR156b* 與 *osa-MIR156h* 分別構築於植物表現載體，轉殖於水稻做大量表現時，水稻分蘗成高分蘗數之外表性狀。且 *MIR156* 之大量表現也會抑制 *SPL* 基因表現。水稻中研究最明瞭的 *SPL* 基因分別為 *OsSPL14* 與 *OsSPL16*，其中 *OsSPL14* 的功能為增加穗之分枝，提高產量，並會抑制分蘗數的生成，減少分蘗數；另外 *OsSPL16* 與調控細胞之增生以及跟種子之成熟、飽滿度相關，影響水稻種子產量 (Wang et al., 2012)。根據上述文獻探討，得知 *MIR156* 在阿拉伯芥及水稻中會抑制 *SPL* 基因表現，使植株產生生長期延長、晚開花、低稔實率及分蘗數增加等性狀，與 *M69217* 之性狀相似，因此我們推測水稻突變體 *M69217* 之異常性狀與 *MIR156* 的活化有關。

藉由探討眾多與水稻基因有關的論文與研究期刊，我們得到了上述有關 CM、CCR、GNAT 和 MIR156 在水稻植株中所扮演的功能與角色，推測此四個基因都有可能影響水稻的分蘗數。未來會將上述四個基因構築於植物轉殖載體並嘗試製造個別基因轉殖株，以進一步觀察其轉殖株與 M69217 外表性狀的相似度，確認其是否為調控水稻分蘗數的關鍵基因。

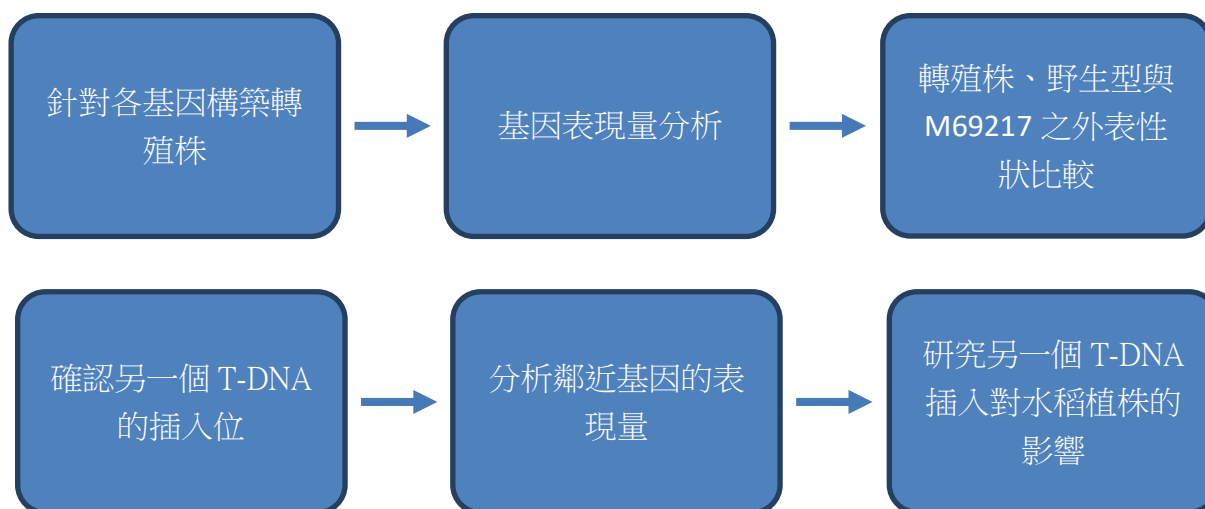
二、我們根據 M69217 不同基因型的外表性狀調查發現，多分蘗之現象主要受水稻第二號染色體 BAC : OJ1297_C09 之 36,560 bp 插入位上的 T-DNA 所影響，這個 T-DNA 插入位與植株外表型有高度關聯性。然而，在前人研究中，透過南方墨點法偵測 M69217 之 T-DNA 拷貝數，得知 M69217 基因體具有兩個 T-DNA 插入位（附件）。本研究透過基因型和外表型之比較，證實多分蘗之性狀會受第二號染色體 BAC : OJ1297_C09 之 36,560 bp 位置所調控，然而我們仍無法排除另一個 T-DNA 的插入位也有可能會影響水稻突變體 M69217 的外表性狀。而未來，我們也會透過質體救援確認另一個 T-DNA 的插入位，再由 RiceGAAS 水稻基因體資料庫中搜尋此 T-DNA 插入位鄰近的基因訊息，最後透過 RT-PCR 分析鄰近基因的表現量，進一步研究另一個 T-DNA 插入對水稻植株造成的影響。

柒、結論與未來展望

- 一、透過基因型分析，我們得知 T-DNA 在水稻第二號染色體 BAC : OJ1297_C09 之 36,560 bp 的插入對水稻外表造成多方面的影響，且植株基因型與外表型具有高度的關聯性。
- 二、由 RiceGAAS 資料庫中得知水稻突變體 M69217 的 T-DNA 插入位附近有四個可被活化的基因：CM、CCR、GNAT 和 MIR156，並透過 RT-PCR 分析發現，和野生型相比，這四個基因皆有被活化的現象，並利用文獻探討推測這四個基因皆有可能與水稻多分蘗的性狀有關。

三、 未來我們將嘗試構築上述四個基因的個別基因轉殖株，進一步比較野生型與轉植株的性狀與基因表現，更深入了解影響水稻分蘗數的關鍵基因。

四、 未來我們也會透過質體救援確認另一個 T-DNA 的插入位，並透過 RT-PCR 分析插入位鄰近基因的表現量，進一步研究另一個 T-DNA 插入對水稻植株造成的影響。



捌、參考資料及其他

1. 中央研究院植物基因組中心。 <http://genome.sinica.edu.tw/chinese/about.htm>
2. TRIM 資料庫。 http://trim.sinica.edu.tw/introduction_c
3. 生物技術－微型核糖核酸的介紹以及應用 (MicroRNA) 科技部高瞻自然科學教學資源平台。 <http://highscope.ch.ntu.edu.tw/wordpress/?tag=microrna>

Baltas, M., Lapeyre, C., Bedos-Belval, F., Maturano, M., Saint-Aguet, P., Roussel, L., Duran, H., and Grima-Pettenati, J. (2005). Kinetic and inhibition studies of cinnamoyl-CoA reductase 1 from *Arabidopsis thaliana*. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale* **43**, 746-753.

Eberhard, J., Raesecke, H.R., Schmid, J., and Amrhein, N. (1993). Cloning and expression in yeast of a higher plant chorismate mutase. *Molecular cloning, sequencing of the cDNA and characterization of the Arabidopsis thaliana enzyme expressed in yeast.* *FEBS letters* **334**, 233-236.

Grunstein, M. (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* **389**, 349-352.

Hsing, Y.I., Chern, C.G., Fan, M.J., Lu, P.C., Chen, K.T., Lo, S.F., Sun, P.K., Ho, S.L., Lee, K.W., Wang, Y.C., Huang, W.L., Ko, S.S., Chen, S., Chen, J.L., Chung, C.I., Lin, Y.C., Hour, A.L., Wang, Y.W.,

- Chang, Y.C., Tsai, M.W., Lin, Y.S., Chen, Y.C., Yen, H.M., Li, C.P., Wey, C.K., Tseng, C.S., Lai, M.H., Huang, S.C., Chen, L.J., and Yu, S.M.** (2007). A rice gene activation/knockout mutant resource for high throughput functional genomics. *Plant molecular biology* **63**, 351-364.
- Jones, L., Ennos, A.R., and Turner, S.R.** (2001). Cloning and characterization of irregular xylem4 (irx4): a severely lignin-deficient mutant of Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **26**, 205-216.
- Kanjanaphachot, P., Wei, B.Y., Lo, S.F., Wang, I.W., Wang, C.S., Yu, S.M., Yen, M.L., Chiu, S.H., Lai, C.C., and Chen, L.J.** (2012). Serotonin accumulation in transgenic rice by over-expressing tryptophan decarboxylase results in a dark brown phenotype and stunted growth. *Plant molecular biology* **78**, 525-543.
- Kim, G.W., Gocevski, G., Wu, C.J., and Yang, X.J.** (2010). Dietary, metabolic, and potentially environmental modulation of the lysine acetylation machinery. *International journal of cell biology* **2010**, 632739.
- Klein, J., Saedler, H., and Huijser, P.** (1996). A new family of DNA binding proteins includes putative transcriptional regulators of the *Antirrhinum majus* floral meristem identity gene SQUAMOSA. *Molecular & general genetics : MGG* **250**, 7-16.
- Liu, L., Tong, H., Xiao, Y., Che, R., Xu, F., Hu, B., Liang, C., Chu, J., Li, J., and Chu, C.** (2015). Activation of Big Grain1 significantly improves grain size by regulating auxin transport in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, 11102-11107.
- Lo, S.F., Yang, S.Y., Chen, K.T., Hsing, Y.I., Zeevaert, J.A., Chen, L.J., and Yu, S.M.** (2008). A novel class of gibberellin 2-oxidases control semidwarfism, tillering, and root development in rice. *The Plant cell* **20**, 2603-2618.
- Miura, K., Ikeda, M., Matsubara, A., Song, X.J., Ito, M., Asano, K., Matsuoka, M., Kitano, H., and Ashikari, M.** (2010). OsSPL14 promotes panicle branching and higher grain productivity in rice. *Nature genetics* **42**, 545-549.
- Servet, C., Conde e Silva, N., and Zhou, D.X.** (2010). Histone acetyltransferase AtGCN5/HAG1 is a versatile regulator of developmental and inducible gene expression in Arabidopsis. *Molecular plant* **3**, 670-677.
- Tamasloukht, B., Wong Quai Lam, M.S., Martinez, Y., Tozo, K., Barbier, O., Jourda, C., Jauneau, A., Borderies, G., Balzergue, S., Renou, J.P., Huguette, S., Martinant, J.P., Tatout, C., Lapierre, C., Barriere, Y., Goffner, D., and Pichon, M.** (2011). Characterization of a cinnamoyl-CoA reductase 1 (CCR1) mutant in maize: effects on lignification, fibre development, and global gene expression. *Journal of experimental botany* **62**, 3837-3848.
- Tu, Y., Rochfort, S., Liu, Z., Ran, Y., Griffith, M., Badenhorst, P., Louie, G.V., Bowman, M.E., Smith, K.F., Noel, J.P., Mouradov, A., and Spangenberg, G.** (2010). Functional analyses of caffeic acid O-Methyltransferase and Cinnamoyl-CoA-reductase genes from perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *The Plant cell* **22**, 3357-3373.
- Tzin, V., and Galili, G.** (2010). The Biosynthetic Pathways for Shikimate and Aromatic Amino Acids

in *Arabidopsis thaliana*. The *Arabidopsis* book / American Society of Plant Biologists **8**, e0132.

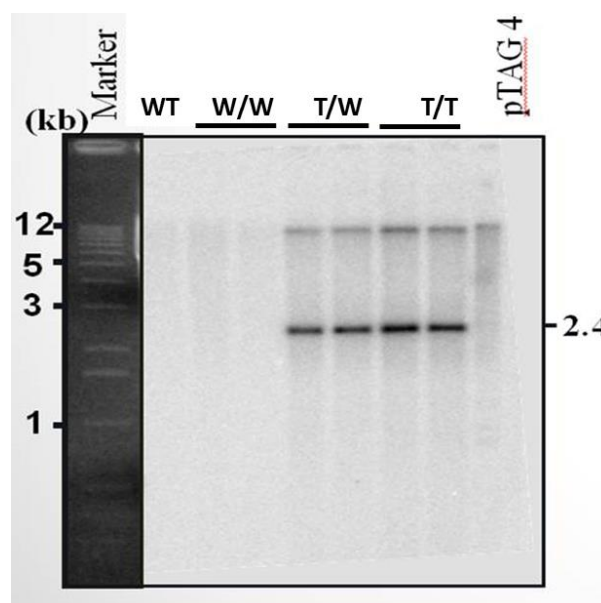
Uga, Y., Kitomi, Y., Ishikawa, S., and Yano, M. (2015). Genetic improvement for root growth angle to enhance crop production. *Breeding science* **65**, 111-119.

Wang, S., Wu, K., Yuan, Q., Liu, X., Liu, Z., Lin, X., Zeng, R., Zhu, H., Dong, G., Qian, Q., Zhang, G., and Fu, X. (2012). Control of grain size, shape and quality by OsSPL16 in rice. *Nature genetics* **44**, 950-954.

Wu, G., and Poethig, R.S. (2006). Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target SPL3. *Development* **133**, 3539-3547.

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 physiology* **142**, 280-293.

附件



南方墨點法結果

【評語】 052101

1. 本實驗探討水稻分蘖的關鍵基因，成果深具實際應用之潛力。
2. 能充分應用所學及最先進的實驗方法設計實驗，並進一步推論出影響分蘖的相關基因。
3. 建議加強瞭解如何利用基因轉殖的策略以確切證實幾個相關基因的角色。