

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

佳作

052108

阿拉伯芥在高碳低氮環境中以染色體修飾調節
花青素的合成

學校名稱：臺北市立第一女子高級中學

作者： 高二 廖品婷 高二 林雨萱	指導老師： 陳怡旻 孫譽真
-------------------------	---------------------

關鍵詞：阿拉伯芥、染色體修飾、花青素合成

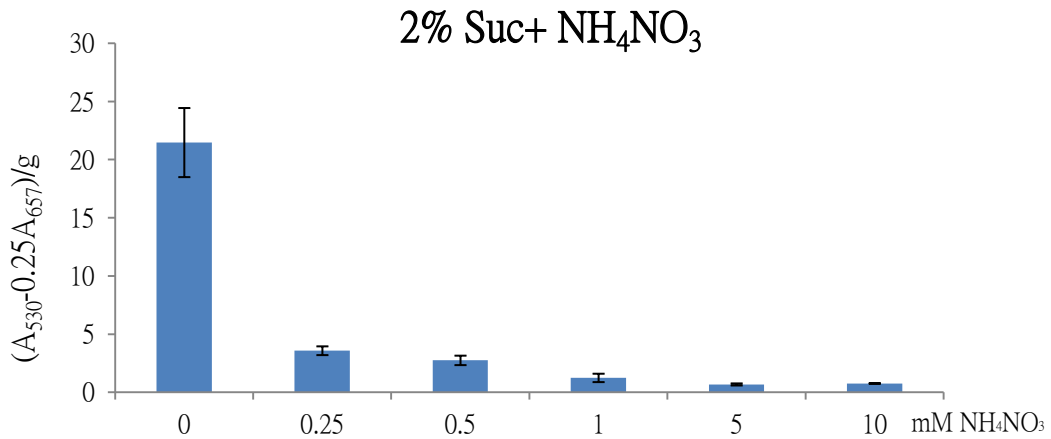
摘要

植物在碳過多或氮不足的環境中會累積過多的花青素，然而我們對植物以什麼機制來調控高碳低氮下花青素的合成並不清楚。為了研究有哪些基因參與花青素合成的調控，我們透過調整培養基中碳氮的比例，篩選到高碳低氮下會有花青素過度累積性狀的阿拉伯芥突變種 *19945*。經由遺傳分析、基因圖譜定位與基因體定序的結果，我們找到 *19945* 的突變基因為 *At3g18520*，其產物為組蛋白去乙酰酶 histone deacetylase 15 (HDA15)。HDA 可以降低染色體組蛋白乙酰化的程度，使組蛋白與 DNA 纏繞緊密進而抑制基因的表現。與野生種相較，突變株 *19945* 在高碳低氮下，會過度誘導調控花青素合成的轉錄因子 *PAP1*、*TT8* 與花青素合成酵素 *DFR*、*LDOX*、*UF3GT* 的基因表現，因此我們推斷 HDA15 可透過染色體修飾來調控高碳低氮下花青素的合成。

壹、前言

已知隨著環境中無機氮濃度的提升，植株中花青素的累積量會被抑制。(Peng et al., 2008)

在以 1/2MS(-N)+2% 蔗糖(sucrose, Suc)+NH₄NO₃的培養基中，可以看到在完全缺氮時，阿拉伯芥野生株會累積大量的花青素，隨著培養基中無機氮 NH₄NO₃濃度提升，花青素累積量則跟著下降(圖一)。

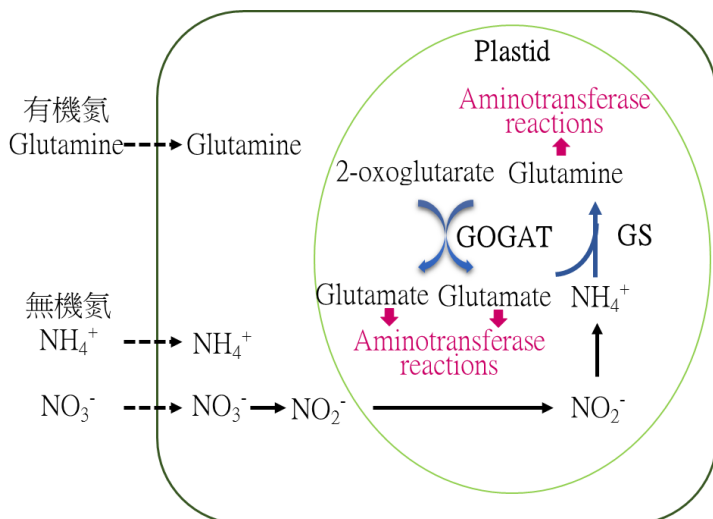


圖一 以無機氮 NH₄NO₃ 為氮源下的花青素含量(平均 ± 標準差，本實驗四重複)。

橫軸為不同 NH₄NO₃ 濃度，縱軸為花青素含量(計算公式(A₅₃₀-0.25A₆₅₇)/g)。

生長條件：1/2 MS(-N)+2% Suc+NH₄NO₃，十天。

在最主要的氮源同化作用中(圖二)，麩醯胺酸(glutamine, Gln)是植物細胞內最基礎的第一個有機氮產物，也是最主要的有機氮運用形式，可經由轉氨作用作為胺基酸、核酸與其他含氮化合物的合成中最主要的氨基提供者(amino donor)(Kan et al., 2015)。

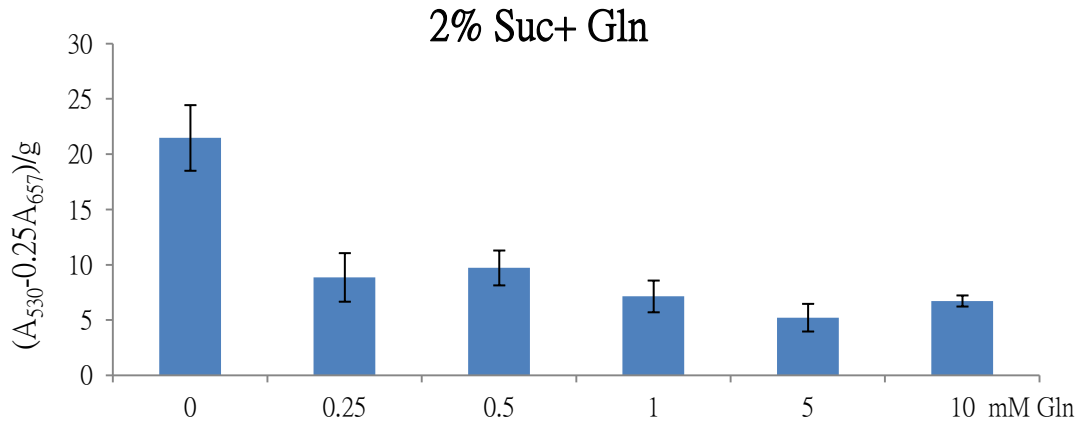


圖二 氮源同化作用。

在 GS/GOGAT cycle 中，銨鹽經由 GS 與 glutamate 結合，產生 glutamine。

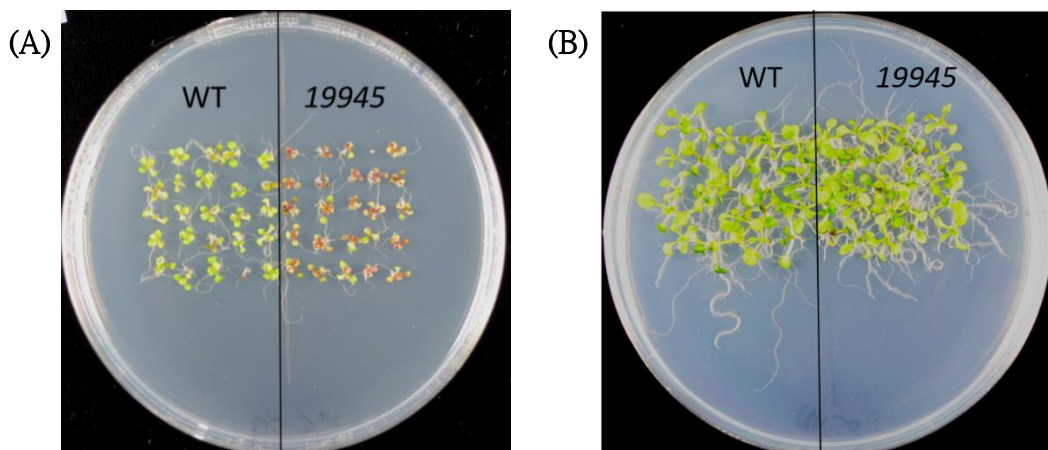
同時，glutamine 會經由 GOGAT 的轉氨作用，將氨基轉移到 oxoglutarate，形成兩個 glutamate，glutamine 與 glutamate 可經由轉氨作用合成其他含氮化合物。

在以有機氮 Gln 作為培養基唯一氮源時，當培養基中的 Gln 濃度上升，與前述無機氮作為唯一氮源培養時相似，花青素的累積量會下降，特別是在 5 mM Gln 的濃度有最低的花青素含量(圖三)。



圖三 以有機氮 Gln 為氮源下的花青素含量(平均±標準差，本實驗四重複)。
橫軸為不同 Gln 濃度，縱軸為花青素含量(計算公式(A₅₃₀-0.25A₆₅₇)/g)。
生長條件：1/2 MS(-N)+2% Suc+Gln，十天。

以 1/2 MS(-N)+2% Suc+5 mM Gln 的培養基篩選近萬顆經 T-DNA 插入的突變株種子，希望找出花青素合成異常的突變株。我們以篩選出的突變株 19945(圖四)，進行研究。在這樣的生長條件下，19945 有過度的花青素累積，導致植株呈現紫紅色的強烈性狀，與野生株(wild type, WT)呈明顯差異；但在以無機氮 NH₄NO₃ 作為唯一氮源的培養基中則沒有明顯差異。



圖四 花青素過度合成之突變株 19945。

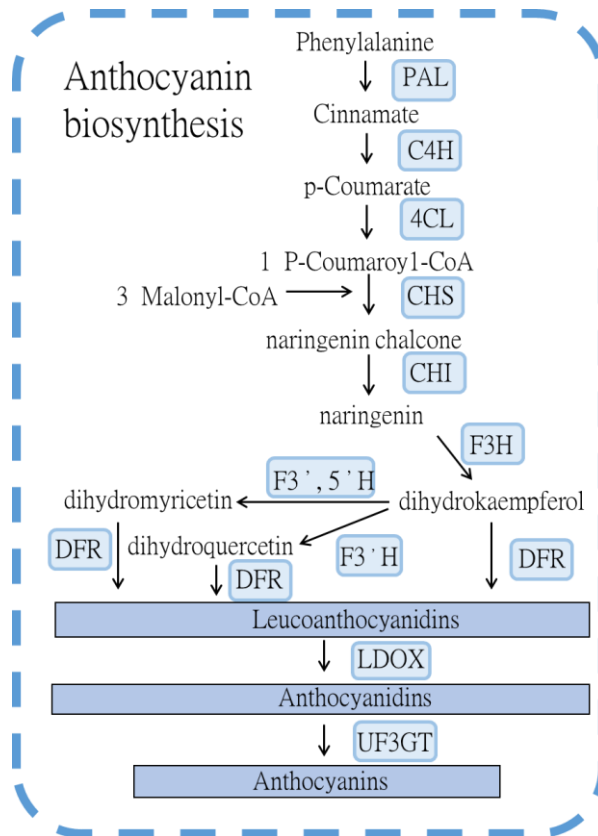
(A)以 Gln 作為唯一氮源 (B)以 NH₄NO₃ 作為唯一氮源

貳、 研究動機

花青素是一群廣泛存在於植物液胞的水溶性色素，顏色可顯現於葉片、花瓣、果實與種子，如藍莓、桑葚、茄子等蔬果都含有豐富的花青素。而在自然界中常見季節變化葉子轉紅的現象如楓紅，也是花青素的變化而產生的現象。近來，越來越多的研究開始重視花青素的抗氧化能力，甚至發現不少醫學上的應用。此外，目前已知其除具備抗氧化能力之外，尚有抗發炎、預防癌症、抗癌等作用。

花青素在我們的生活中處處可見，那花青素在植物內是怎麼合成的呢？這使我們相當感興趣。查了相關文獻後發現花青素的合成途徑十分複雜(圖五)，自苯丙氨酸(phenylalanine)開始，受到 phenylalanine ammonia lyase(PAL)、cinnamic acid 4-hydroxylase(C4H)、4 coumarate(4CL)等多個酵素修飾形成不同的化合物。植物最主要的花青素有三種：紫紅色的矢車菊素(cyaniding)、橘紅色的天竺葵素(pelargonidin)、藍紫色的飛燕草素(delphinidin)後，再藉由不同程度的甲基化以合成更多不同顏色的色素。

一般探討花青素合成的影響因素有溫度、酸鹼值、光照強度等，論文也提及培養基中碳濃度過高或氮濃度過低可分別提高阿拉伯芥花青素的合成(Solfanelli et al., 2006)(Peng et al., 2008)。碳及氮對植物來說都是不可或缺的元素，不同碳氮濃度比對植物的生長發育的過程有重要影響。那麼不同的碳、氮濃度比例會如何影響花青素的合成呢？而影響合成的作用機制和那些基因有關？這都是我們覺得好奇的，於是本實驗將對於以上問題進行研究。



圖五 花青素合成途徑。(Zhou et al., 2012)

參、 研究目的

在前置實驗中我們發現經由 T-DNA 插入的突變株 19945 在以 Gln 作為唯一氮源時，會有花青素過度累積的性狀，而 WT 沒有(圖四)。我們認為 19945 的突變基因與花青素合成有密切關聯，尤其是在以有機氮 Gln 作為氮源時，由於 Gln 具有一段碳鏈，讓植物感受到較 NH_4NO_3 作為氮源時更嚴重高碳低氮、碳氮不平衡的逆境，所以有更高的花青素累積。

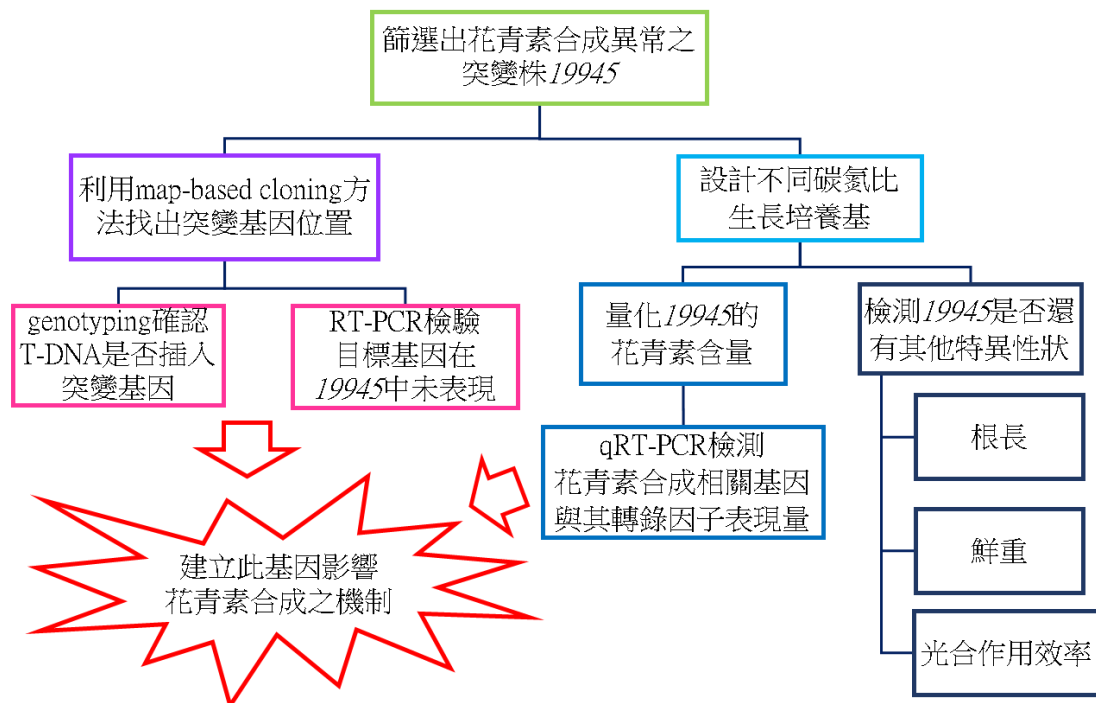
因此，我們認為 19945 的突變基因會受到生長環境中碳氮不平衡的影響，並進而調節花青素的合成。如果我們的假說是正確的，則代表著此突變基因在植物面臨碳氮不平衡的逆境時扮演極重要的角色，可以緩和植物在高碳低氮、碳氮不平衡的逆境，進而調節花青素的合成。

在本研究中我們將先藉由基礎生物(下)單元 4-2：孟德爾的遺傳法則中所提及之孟德爾基因遺傳法則，以及選修生物(下)單元 11-1：連鎖與互換中所提及之基因聯會互換原理，來進行

基因圖譜(map-based cloning)，找出 19945 的突變基因。再透過不同碳氮比的生長條件下，WT 和 19945 的花青素含量差異，來推導此突變基因會使植株花青素過度合成的時機及原因，最後透過 qRT-PCR 實驗，建立此基因在阿拉伯芥中調節花青素合成的機制。

我們的研究目的如下(實驗架構請見圖六)：

- 一、找出阿拉伯芥突變株 19945 的突變基因
- 二、確認目標基因發生突變的原因
- 三、檢驗目標基因在 19945 中未表現
- 四、設計不同碳氮比生長培養基，量化 19945 的花青素含量
- 五、檢測花青素合成途徑基因與其轉錄因子表現量
- 六、建立目標基因影響花青素合成之機制
- 七、設計不同碳氮比生長培養基，檢測如何影響 19945 其他性狀的表現
 - (一) 根長
 - (二) 鮮重
 - (三) 光合作用效率



圖六 研究架構。

肆、 研究設備與器材

一、研究材料

本實驗使用的模式生物為阿拉伯芥：

(一) 野生種(wild type, WT)：Landsberg erecta(*Ler*)、Columbia-6(Col-6)

(二) 突變種：19945，來自於 Arabidopsis Biology Resource Center，為 Col-6 經花序沾黏法(floral dipping)插入 T-DNA 產生的突變株。

二、研究器材

培養皿(圓形、方形)、秤量紙、實驗衣、量筒、燒杯、刮勺、酒精燈、塑膠滴管、玻璃滴管、封口蠟膜、鑷子、單眼相機、電腦軟體(IGV、ImageJ、Imaging Win、Sequence Scanner v1.0、QuantStudio 12K Flex Software)、培養土、竹籤、植株固定夾、離心管(100 μ L、1.5 mL、2 mL)、樣品粉碎機、瓷球、恆溫水浴槽、乾浴槽、微量吸取器(P10、P20、P200、P1000)、電子刻度移液器、離心機、電子秤、聚合酶連鎖反應儀、冰箱(-80°C、-20°C、4°C)、電泳槽、保鮮膜、乳膠手套、供電機、紫外線照膠系統、熱感應紙、紫外光可見光光譜儀、鋁箔紙、葉綠素螢光影像分析系統、酸鹼檢驗器、盆栽、托盤、滅菌機、無菌操作台、微量多孔盤、QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (ThermoFisher)

三、實驗藥品

Murashige and Skoog Basal Medium、蔗糖(sucrose)、瓊脂(agar)、glutamine(Gln)、NH₄NO₃、去離子水、漂白水、緩衝劑(MES)、展著劑(Tween-20)、Taq 聚合酶 DNA extraction buffer、phenol chloroform isoamyl alcohol(PCI)、NaOAc、2-propanol、EtOH、TAE、EtBr、HCl、MeOH、Dye、Bio-100™ Mass DNA Ladder(marker)、Phusion HF buffer、dNTPs、Phusion DNA polymerase、TURBO DNase buffer、TURBO DNase、Power SYBR® Green PCR Master Mix (2X)、Primers(詳見附錄一)

伍、 研究設計與流程

一、篩選出花青素合成異常之突變株

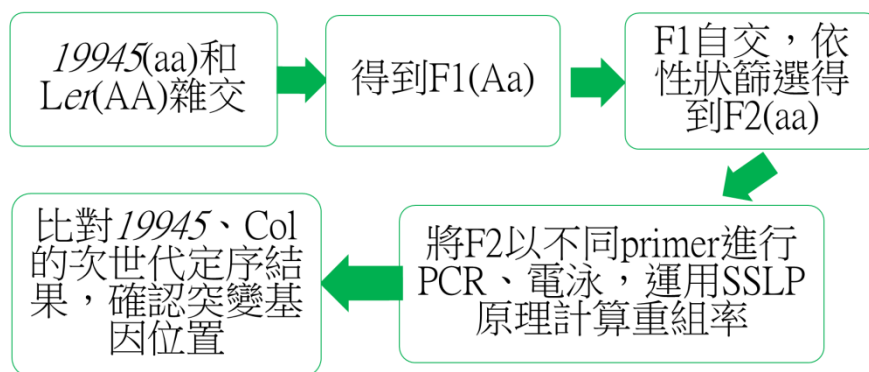
(一)將 WT 與不同的 T-DNA 插入突變株種在以 Gln 作為唯一氮源的固態培養基(0.8% agar)，與一般營養條件的培養基上，培養基成分分別如下：

1. 一般營養條件：1/2 MS 培養基(0.5X Murashige and Skoog Basal Medium)+ 2% sucrose(質量體積比)
2. 以 Gln 作為唯一氮源的培養基，我們選用 1/2 MS(-N)培養基，以確保培養基除 Gln 外沒有其他氮源：1/2 MS(-N)培養基(0.5X Murashige and Skoog Basal Medium(without nitrogen))+ 2% sucrose(質量體積比) +5 mM Gln

(二)十日後觀察突變株與野生株在以 Gln 為唯一氮源的培養基與一般營養條件的培養基上的生長情形，篩選具有特別性狀的突變株

二、進行基因圖譜(map-based cloning)找出突變株 19945 突變基因位置

我們選擇以 Simple Sequence Length Polymorphisms(SSLPs) 的方法進行 map-based cloning，SSLPs 是一種運用阿拉伯芥野生株基因長度不同的多樣性，找出目標基因的方法，流程如(圖七)。

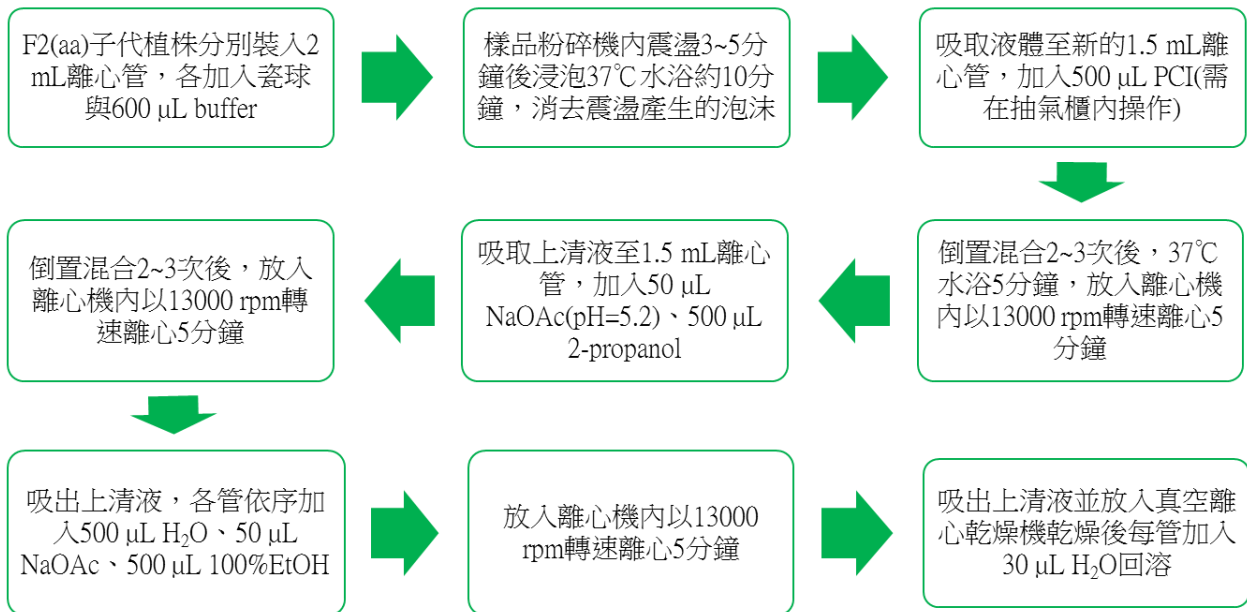


圖七 map-based cloning 流程圖。

突變株 19945 衍生自 Col，所以我們選擇了另一種無花青素合成異常性狀的阿拉伯芥 WT：Landsberg erecta(Ler)進行實驗。首先，我們將 19945 與 WT 雜交，我們發現進行雜交後的 F1 子代表現型都與 WT 相似，根據孟德爾基因遺傳法則，我們可以推論 19945 是一個隱性遺傳的突變株。因此，我們合理假設 19945 突變基因的基因型為隱性的 aa，而 WT 的基因型為顯

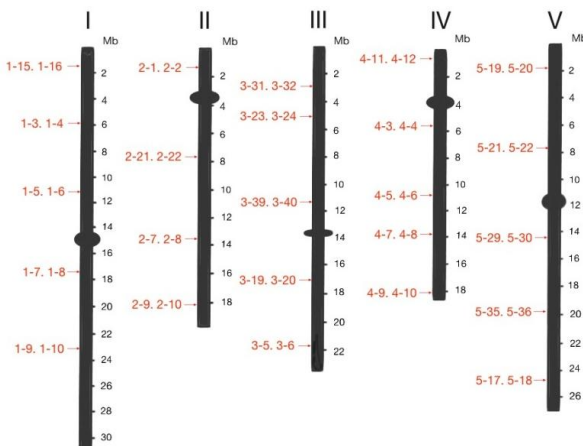
性的 AA，取得 F1 子代後我們仍會將雜交得到的種子種在以 Gln 為唯一氮源的培養基培育幼苗，藉由表現型檢驗幼苗確實透過雜交而形成 Aa，避免篩選到母本 19945 在自交情況下產生的子代。之後讓 F1 移土生長並自交，再以 Gln 為唯一氮源的培養基培育幼苗，經由表現型觀察篩選出基因型為 aa 的 F2 子代。再來，我們分析比較 F2(aa)子代基因來源並計算重組率。

首先，收取 F2(aa)子代樣本並抽取 DNA，步驟如下(圖八)：



圖八 抽取 DNA 步驟。

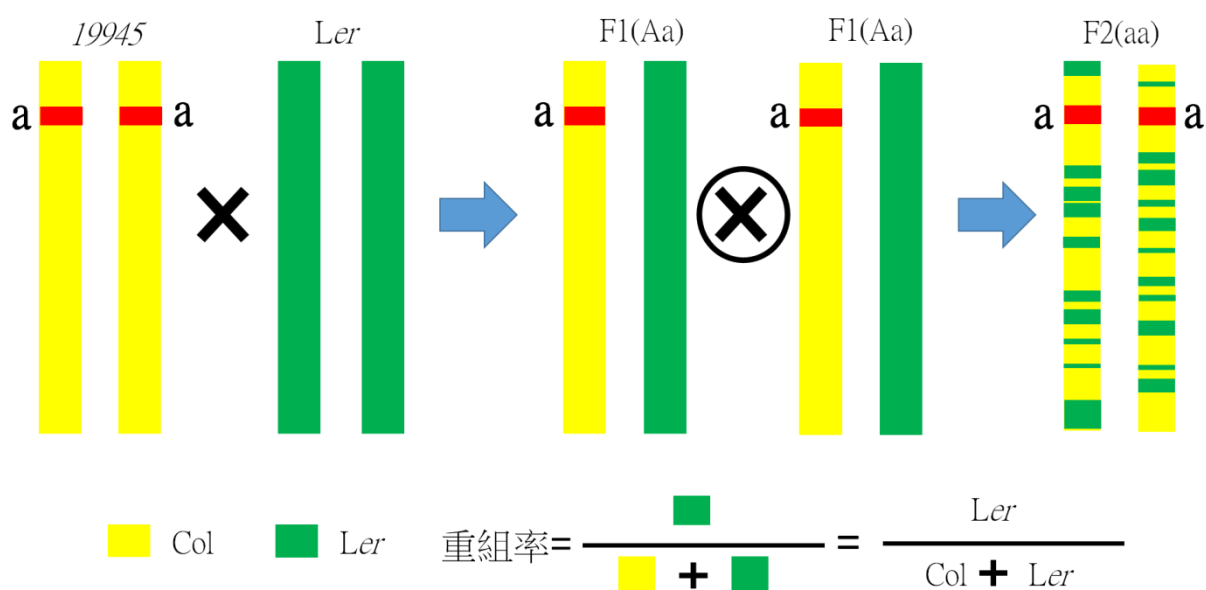
接著，利用聚合酶連鎖反應(PCR)技術，使用 24 組 Mon Arabidopsis mapping primer(圖九)夾出 F2(aa)子代 DNA 片段大量複製。以聚合酶連鎖反應器控制溫度：94°C 加熱 30 秒，55°C 加熱 30 秒，72°C 加熱 60 秒，溫度變化總共循環 36 回。94°C 使 DNA 變性解旋，55°C 是 primer 適合作用的溫度，72°C 是 Taq 聚合酶適合作用的溫度。



圖九 Mon Arabidopsis mapping primer 在阿拉伯芥染色體上分布位置。

19945 是 Col 經一段 T-DNA 插入後產生的突變株，F2 是從 19945 和 Ler 雜交產生 F1 子代再自交授粉篩選而來，在兩次有性生殖的過程中，經過一次 19945、Ler 基因組隨機聯會互換，呈現 Col 和 Ler 基因混雜。我們將 F2、Col、Ler 進行 PCR 後的 DNA 進行膠體電泳，由於 Col 和 Ler 的基因長短差異，因此我們利用膠體電泳分離不同大小的基因來計算重組率。

F2 基因型為 aa，aa 來自 19945，所以此片段未經 Ler 基因替換，重組率為 0。透過膠體電泳的結果，可計算出 F2 在不同 primer 所夾片段的重組率，找出重組率越低的片段，即為突變基因大概位置，計算重組率示意圖如下(圖十)：



圖十 重組率計算原理示意圖。

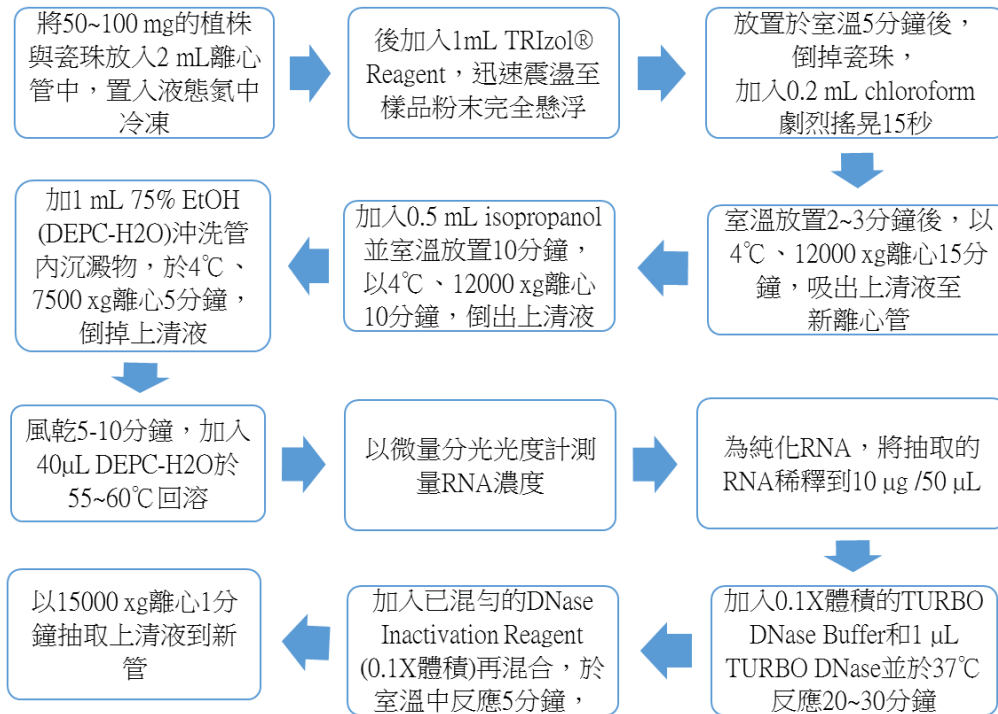
接下來檢視 19945 和 Col 的次世代定序(Next Generation Sequencing, NGS)結果。次世代定序是一種藉由大量而快速來進行短序列片段的全基因組定序。在得到突變基因大概範圍之後，我們可以檢視此範圍內 19945 和 Col 有差異的基因序列，並確認此範圍是否有被 T-DNA 插入之突變基因。

三、進行基因鑑定(genotyping)，確認目標基因是否被 T-DNA 插入而發生突變

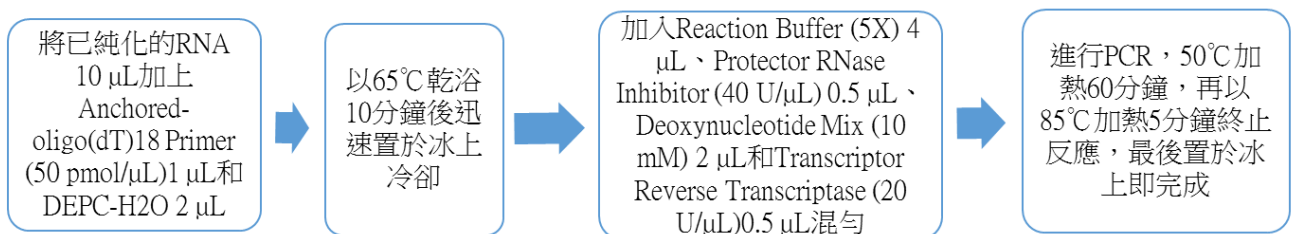
我們在突變基因上自行設計 primer，搭配 T-DNA 上的 primer 將 19945 與 WT 的 DNA 進行 PCR、膠體電泳，進行基因型鑑定，確認此突變基因確有 T-DNA 插入。

四、進行反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-PCR)確認目標基因在 19945 中未表現

首先，抽 19945 與 WT 的 RNA(步驟如圖十一)，接下來將 RNA 反轉錄成 cDNA(步驟如圖十二)後即可將 WT 和 19945 的 cDNA 進行膠體電泳，確認突變基因在 19945 中未表現。



圖十一 抽取 RNA 步驟。



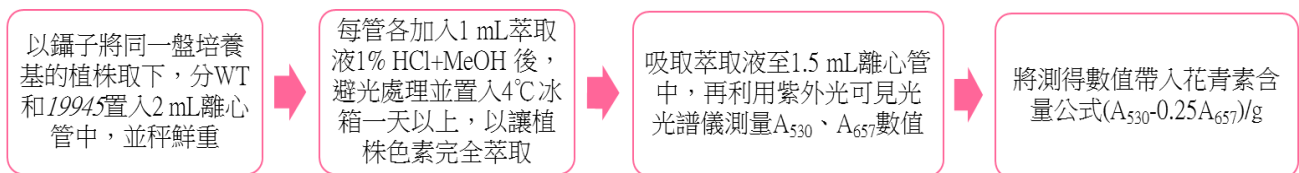
圖十二 RNA 反轉錄成 cDNA 步驟。

五、設計不同碳氮比生長培養基，量化 19945 的花青素含量

為了更進一步掌握突變株 19945 的突變性狀，透過初步觀察、分析不同碳氮比情況下 19945 的花青素含量後，我們調整 sucrose(Suc)濃度來當作培養基碳源濃度的調控，以及調整有機氮 Gln 和無機氮 NH_4NO_3 的濃度，設計出不同碳氮比的培養基(培養基成分如圖十三)，以測量植株(生長天數十天)的花青素含量(方法見圖十四)：

$$\frac{1}{2} \text{MS}(-\text{N}) + \begin{cases} 0.5\% \text{ Suc} \\ 1\% \\ 2\% \end{cases} + \begin{cases} 0 \text{ mM} \\ 0.25 \text{ mM} \\ 0.5 \text{ mM} \\ 1 \text{ mM} \\ 5 \text{ mM} \\ 10 \text{ mM} \end{cases} \begin{cases} \text{Gln} \\ \text{NH}_4\text{NO}_3 \end{cases}$$

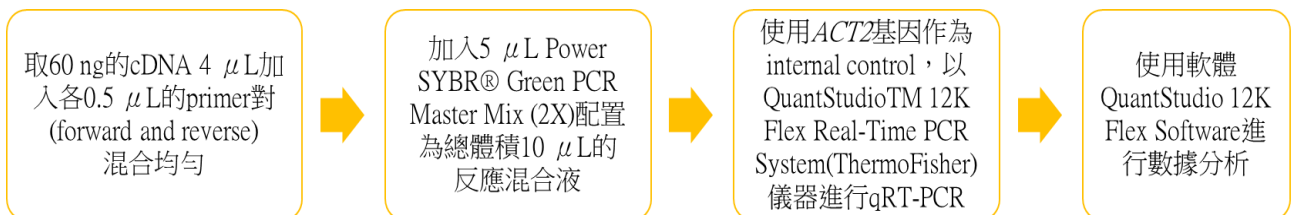
圖十三 不同碳氮比設計。



圖十四 測量花青素含量方法。

六、進行即時定量聚合酶連鎖反應 (Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction, qRT-PCR) 檢測花青素合成相關基因與其轉錄因子表現量

取 WT 及 19945 的 cDNA，以 qRT-PCR 方法(方法見圖十五)來檢測所有花青素合成相關基因：*PAL*、*C4H*、*4CL*、*CHS*、*CHI*、*F3H*、*F3'H*、*DFR*、*LDOX*、*UF3GT*，以及轉錄因子：*PAP1*、*PAP2*、*TT8*、*GL3*、*EGL3*、*TTG1*、*MYBL2*、*JAZ* 在 WT 及 19945 表現量差異，以了解目標基因影響植株花青素合成之路徑。



圖十五 qRT-PCR 步驟。

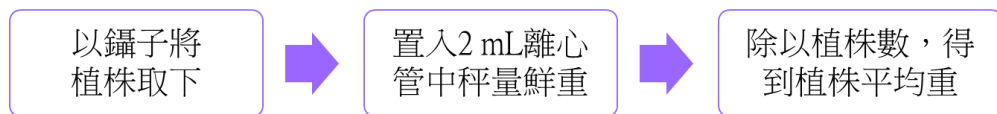
七、設計不同碳氮比生長培養基，檢測 19945 其他性狀表現

為了瞭解 19945 是否有其他突變性狀，我們調整 sucrose 濃度來當作培養基碳源濃度的調控，以及調整有機氮 Gln 和無機氮 NH_4NO_3 的濃度，設計出不同碳氮比的培養基(培養基設計見圖十四)，以測量植株(生長天數十天)根長、鮮重、光合作用效率，步驟如下：

(一) 根長

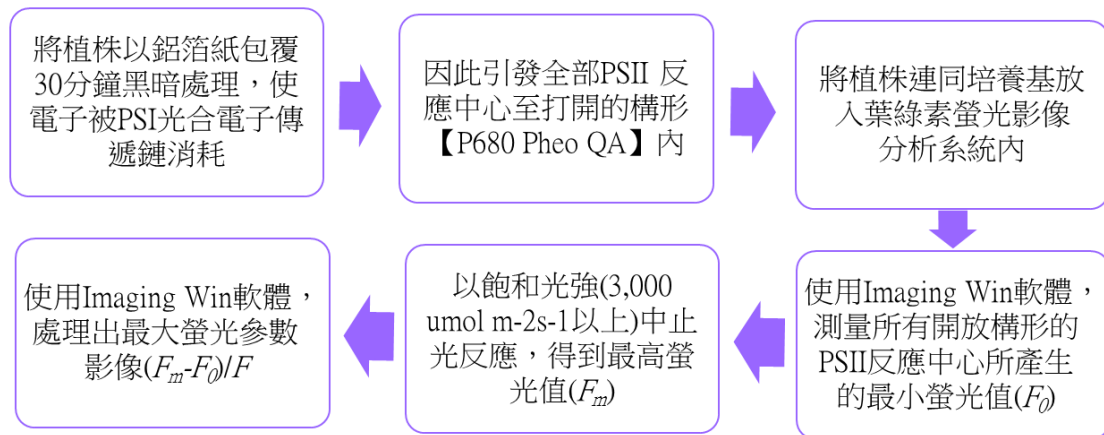
留下實驗結果照片，利用軟體 ImageJ 量化根長。

(二) 鮮重



圖十六 植株鮮重測量方法。

(三) 光合作用效率(劉，2012)



圖十七 植株光合作用效率測量方法。

陸、 研究結果

一、 找出阿拉伯芥突變株 19945 突變基因位置

(一) 將 19945 與 WT(Ler)雜交以取得 F1 子代

我們將雜交後的 F1 子代(圖十八)與 WT 有相同性狀(圖十九), 透過孟德爾基因遺傳法則, 可知 19945 為隱性遺傳的突變株。因此可設 19945 的突變基因基因型為 aa, WT 的基因型則為顯性 AA, 我們篩選出 24 株 F1(Aa)子代, 分別命名為 F1-1~F1-24 進行後續實驗。



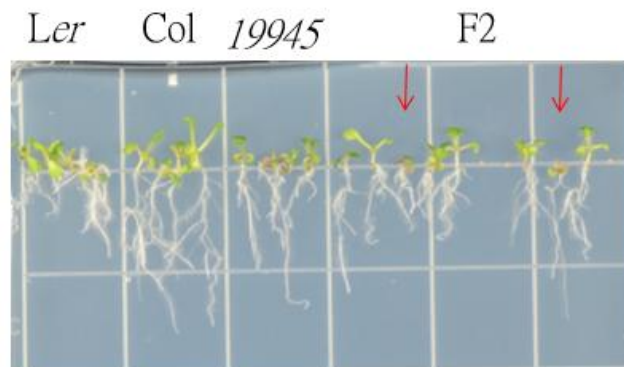
圖十八 進行雜交處理後的果莢(箭號處), 果莢膨大代表成功授粉。



圖十九 篩選 F1 子代(箭號處)。篩選條件：
1/2 MS(-N)+2% Suc+5 mM Gln。

(二) F1(Aa)子代自交取得並篩選 F2(aa)子代

利用表現型與 19945 相似, 篩選出 F1-4 共 27 株、F1-14 共 31 株的 F2(aa)子代(圖二十), 分別命名為 F2-4、F2-14 進行後續實驗。

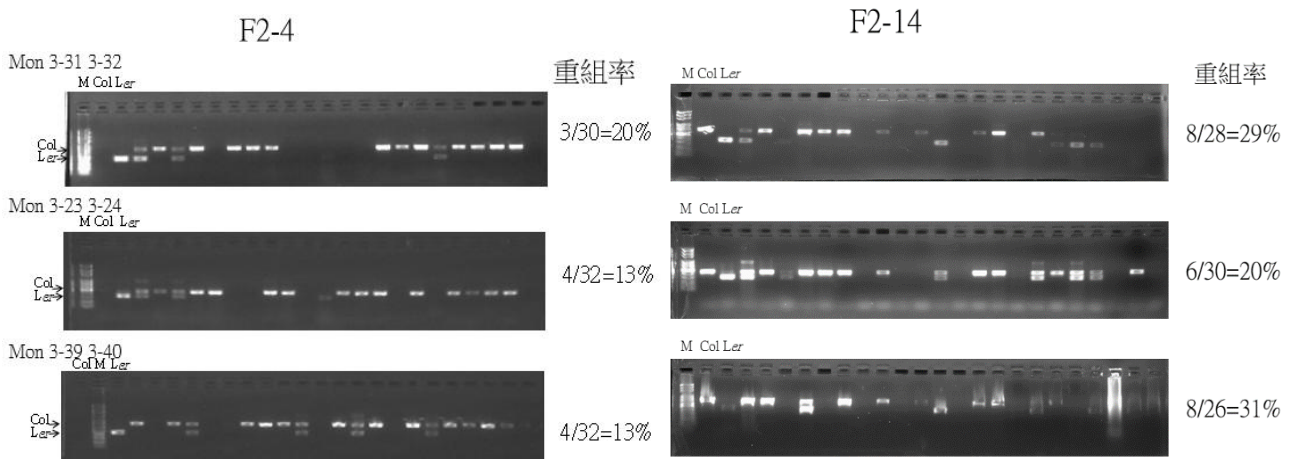


圖二十 篩選 F2 子代(箭號處)。篩選條件：1/2 MS(-N)+2% Suc+5 mM Gln。

(三) 計算 F2(aa)子代重組率，找出突變範圍

以 F2-4 計算重組率結果顯示(圖二十一 A) Mon3-31/32、Mon3-23/24、Mon3-39/40 這三組 primer 所夾片段擁有最低的重組率，分別為 20%、13%及 13%，而其餘 21 組 Mon primer 計算出的重組率都高於這三組；以 F2-14 重複實驗，得到相同結果(圖二十一 B)。

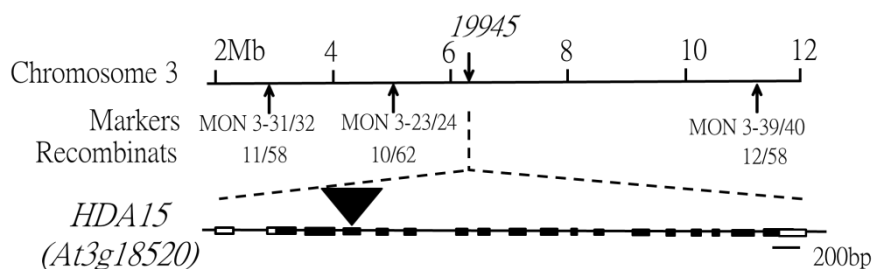
Mon3-31/32、Mon3-23/24、Mon3-39/40 這三組 primer 所在位置，最接近突變發生位置，也就在第三條染色體上臂(圖九)。



圖二十一 Mon3-31/32、Mon3-23/24、Mon3-39/40 三組 primer 進行 F2-4、F2-14 電泳結果，Marker 以 M 簡寫。

(四) 比對次世代定序(NGS)結果，找出突變基因

我們比對 19945、Col 第三對染色體上臂的 NGS 結果，發現 19945 在約 6361900bp 的位置的基因有一段 T-DNA 序列的插入(圖二十二)，而插入位置正好在基因 At3g18520 的第三個外顯子上，此基因即為 19945 的突變基因。此基因的產物即為組蛋白去乙酰酶(histone deacetylase) 家族成員 HDA15。(Malona, 2010) (Alinsug et al.,2012)



圖二十二 19945 的突變基因位置。

二、進行基因鑑定(genotyping)，確認目標基因是否被 T-DNA 插入而發生突變

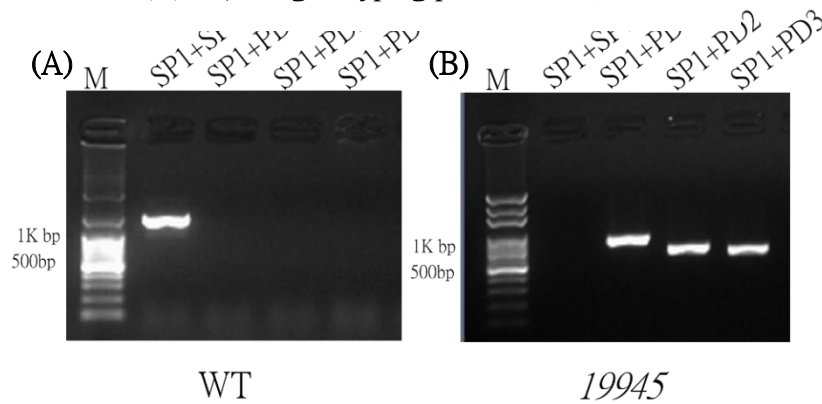
SP1、SP7 為設計在 *HDA15* 第一、六外顯子上的 primer(圖二十三)。WT 沒有 T-DNA 插入，故可夾出 SP1 及 SP7 的 PCR 產物(圖二十四 A)；反之，經 T-DNA 插入的 *19945*，由於此片段序列過長，無法夾出 PCR 產物(圖二十四 B)。

PD1、PD2、PD3 是設計在 T-DNA 上與 SP1 反向的 primer(圖十四)，因為 *19945* 有 T-DNA 插入，故可夾出 PCR 的產物(圖二十四 B)；反之，未經 T-DNA 插入的 WT 則無法(圖二十四 A)。

本實驗證實 *19945* 是同型合子，且確認在 *19945* 的 *HDA15* 上都有 T-DNA 插入。



圖二十三 genotyping primer 相對位置圖。

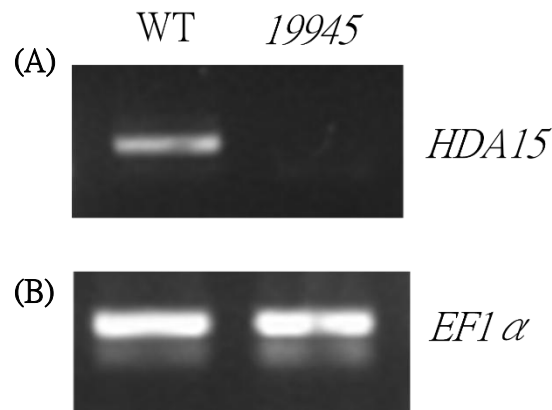


圖二十四 genotyping 結果。(A)WT genotyping 結果。(B)*19945* genotyping 結果。

第一行為 marker(以 M 簡寫)，第二到四行所使用 primer 如圖所示。

三、進行反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-PCR)確認目標基因在 *19945* 中未表現

HDA15 上的 primer 無法在 *19945* 中夾出 PCR 產物(圖二十五 A 右), 在 WT 中則可以(圖二十五 A 左), 此結果確認 *HDA15* 在 *19945* 中未表現。本實驗同時以 housekeeping gene *EF1 α* 作為 loading control(圖二十五 B)。



圖二十五 RT-PCR 結果。

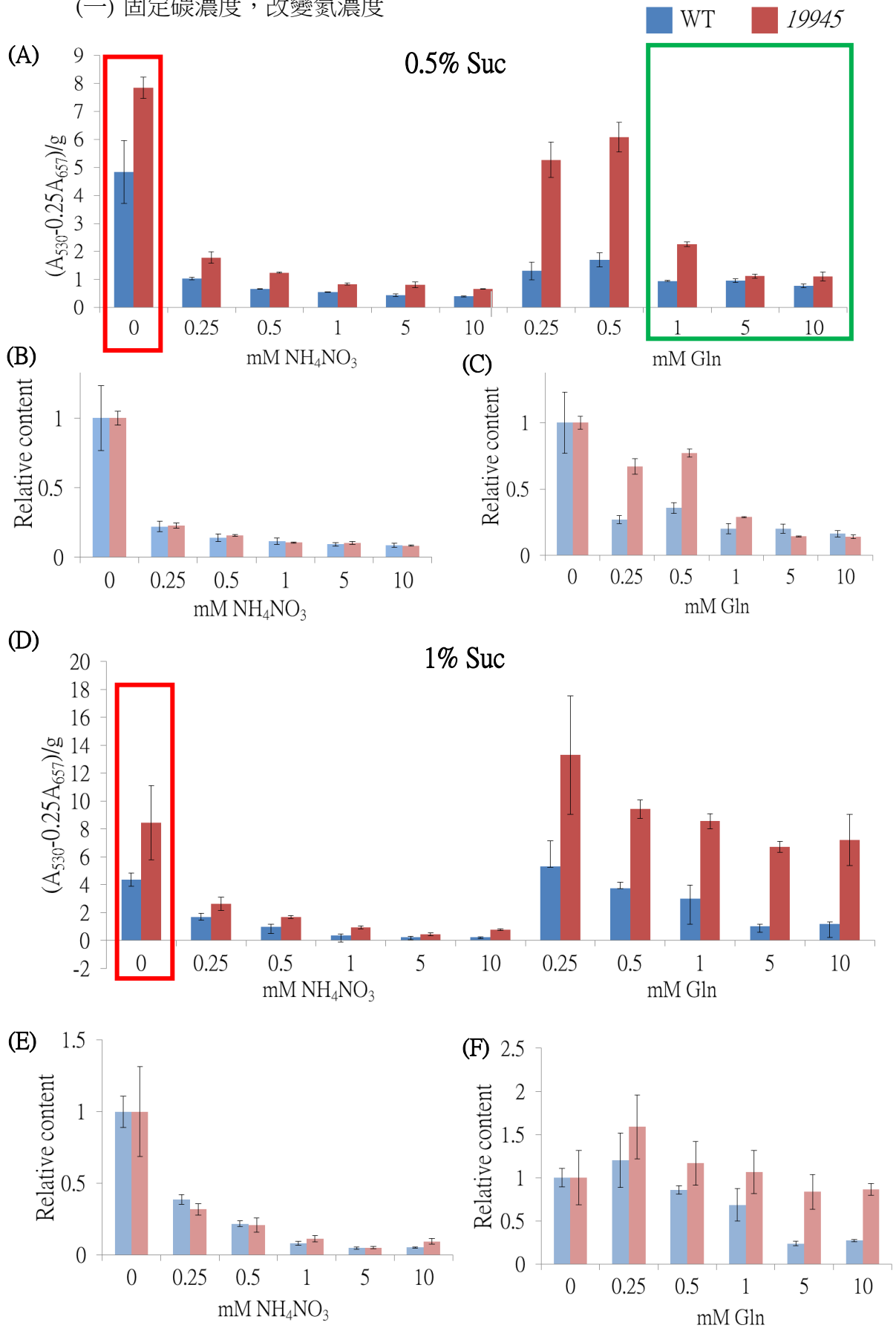
(A)以 *HDA15* 上的 primer 進行。

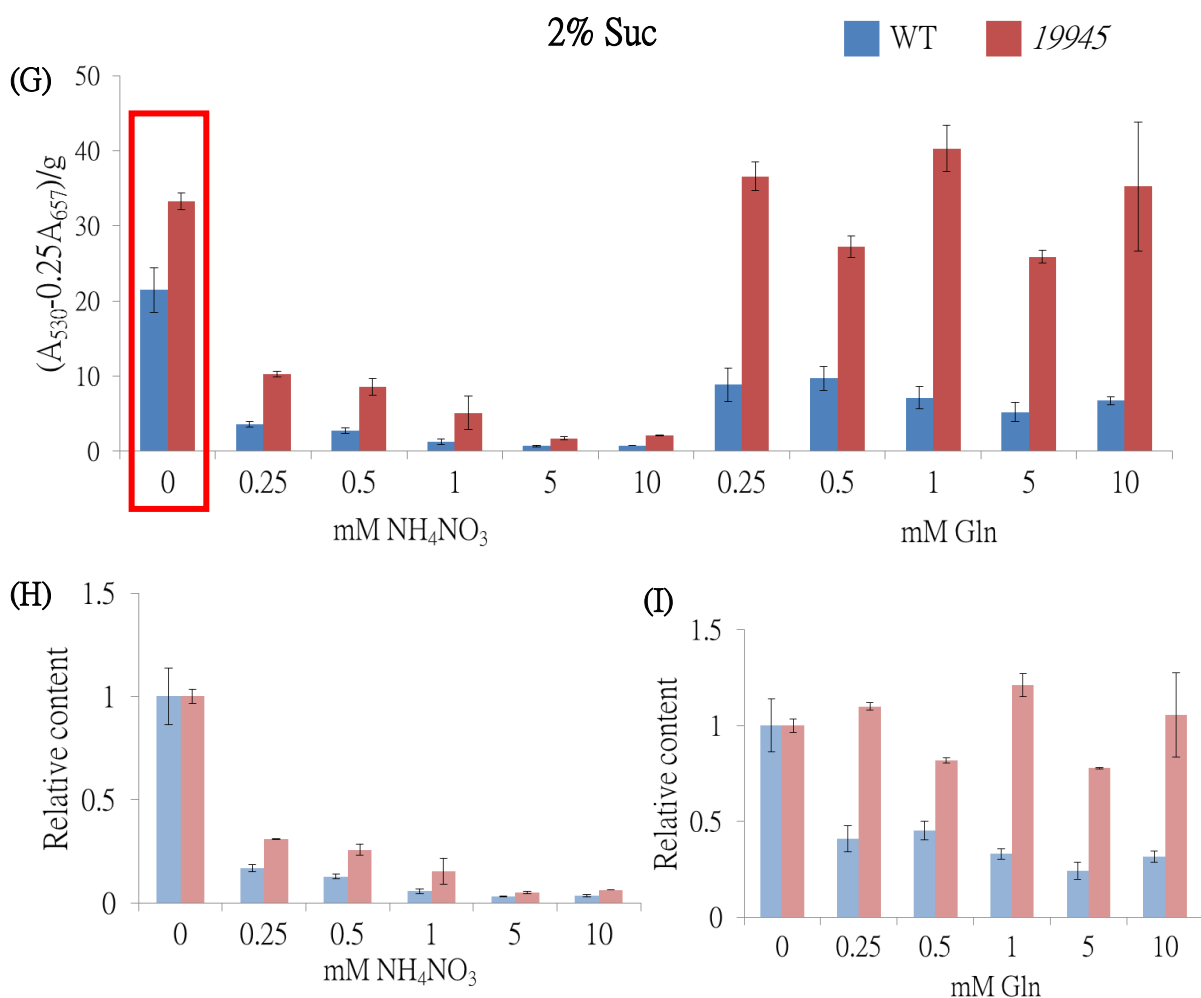
(B)對照組，以管家基因 *EF1 α* 上的 primer 進行。

透過 genotyping 以及 RT-PCR 實驗，我們確認 *19945* 的突變基因 *HDA15* 被 T-DNA 插入，造成此基因突變，在 *19945* 中喪失功能。

四、設計不同碳氮比生長培養基，量化 19945 的花青素含量

(一) 固定碳濃度，改變氮濃度





圖二十六 固定碳濃度，改變氮濃度(平均±標準差，本實驗四重複，生長天數十天)。橫軸為不同氮源、濃度，縱軸為花青素含量(計算公式為 $(A_{530}-0.25A_{657})/g$)、相對含量(分別定 WT 和 19945 在完全缺氮(氮濃度 0 mM)時花青素含量為 1)。(A)(D)(G)為 0.5、1、2% Suc 時花青素含量測定；(B)(C) 0.5% Suc 花青素相對含量。(E)(F) 1% Suc 花青素相對含量。(H)(I) 1% Suc 花青素相對含量。

在固定碳濃度時(圖二十六)，在完全缺氮時(紅色框)，WT 和 19945 都有花青素過度累積的性狀。以 NH_4NO_3 作為唯一氮源時，我們可以看到隨著氮濃度的提升，不論是 WT 或 19945，花青素的合成都有被抑制。而在以有機氮 Gln 作為唯一氮源時，可以發現隨著氮濃度上升，WT 的花青素含量有被抑制，19945 只在 0.5% Suc+1mM Gln(綠色框)明顯被抑制

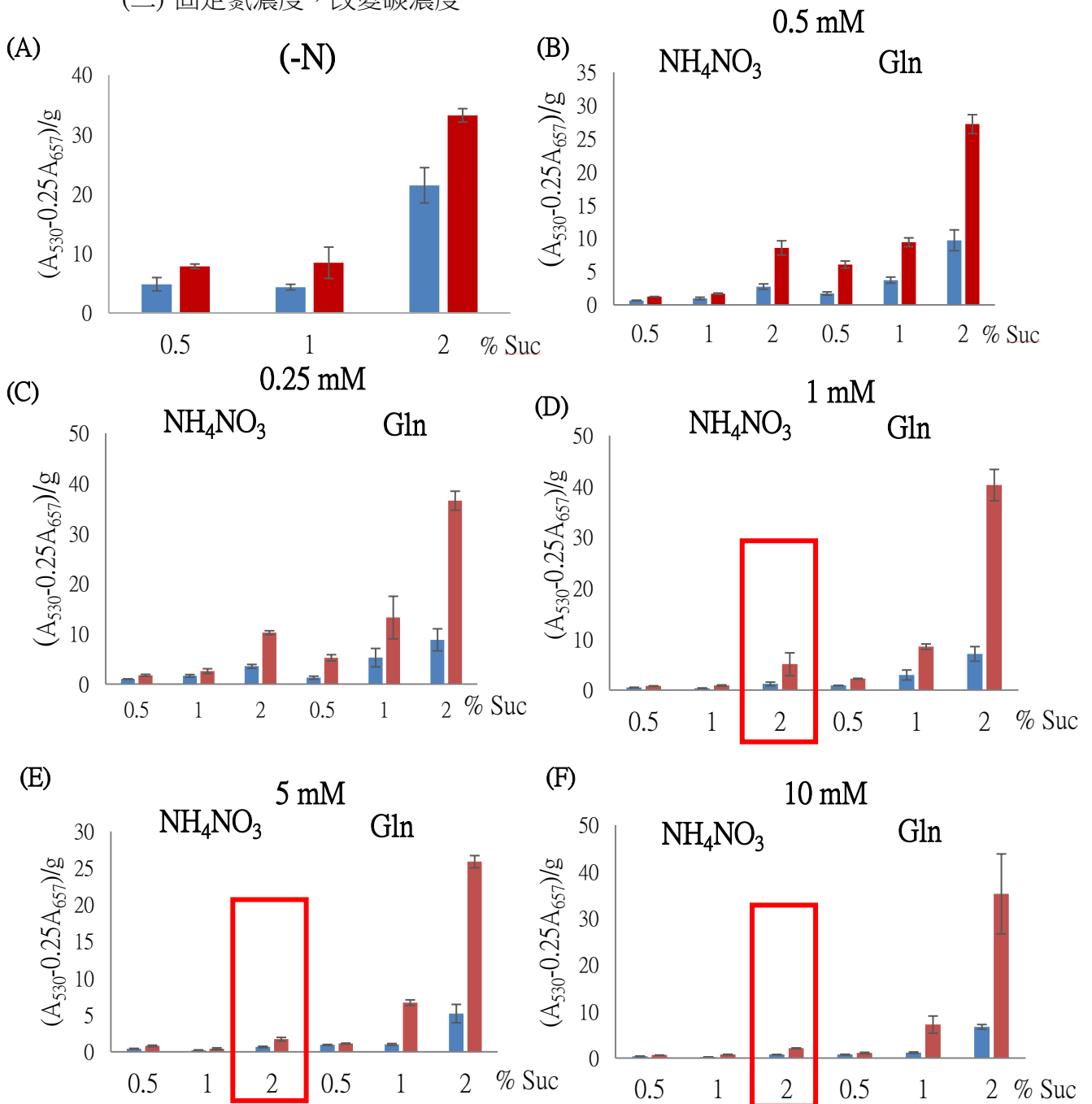
就相對含量而言，以 NH_4NO_3 作為唯一氮源時，配上 0.5%、1% 的 Suc，WT 和 19945 都能有效的利用 NH_4NO_3 ，漸漸達到了碳氮平衡，抑制花青素的合成(圖二十六 BE)；但當 Suc 濃度提升至 2%，19945 相較於 WT，對於花青素累積的抑制能力較差(圖二十六 H)，表示其對於

碳氮不平衡較敏感。

以 Gln 作為唯一氮源時，氮濃度的提升都能有效抑制 WT 的花青素累積(圖二十六 CFI)，但 19945 即便在 Suc 濃度不高時，都較 WT 合成了更多的花青素(圖二十六 CF)，再次驗證 19945 對於碳氮不平衡較 WT 敏感；當 Suc 濃度提高到 2%，再多的 Gln 都無法抑制 19945 花青素的過量累積(圖二十六 I)。

■ WT ■ 19945

(二) 固定氮濃度，改變碳濃度



圖二十七 固定氮濃度，改變碳濃度花青素含量測定(平均±標準差，本實驗四重複，生長天數十天)。橫軸為不同碳濃度，縱軸為花青素含量(計算公式為 $(A_{530}-0.25A_{657})/g$)。。

(A)完全缺氮(-N)花青素含量測定。(B)氮濃度 0.25 mM 花青素含量測定。
(C)氮濃度 0.5 mM 花青素含量測定。(D)氮濃度 1 mM 花青素含量測定。
(E)氮濃度 5mM 花青素含量測定。(F) 氮濃度 10mM 花青素含量測定。

在固定氮濃度時，可以發現不論在什麼氮濃度下，隨著培養基中碳濃度的上升，WT 與 *19945* 的花青素累積量都受到更多的誘導(圖二十七)。

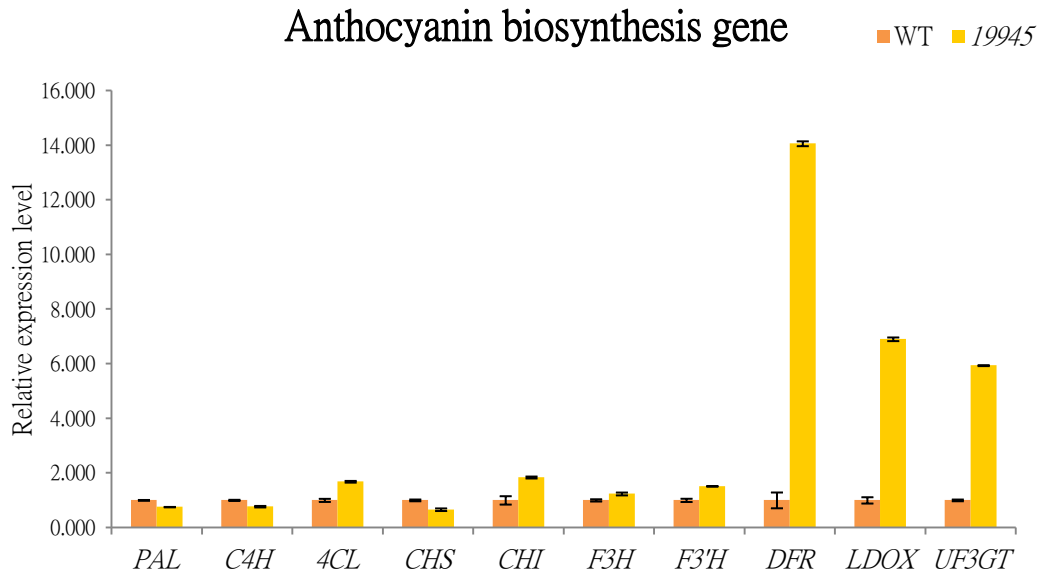
但我們也可以發現，當碳濃度提升到 2% 的高碳生長條件時，WT 仍然可以抑制花青素的合成，而 *19945* 除非無機氮濃度提高到 1、5、10 mM(紅框處)，其餘幾乎無法抑制花青素的過度合成，累積了過量的花青素。

綜合我們的實驗數據，我們可以推論：在高碳低氮造成的碳氮不平衡時，*19945* 比 WT 更為敏感，以至於在相同的碳氮濃度比例下，WT 並沒有感受到碳氮不平衡，沒有累積過多的花青素，而 *19945* 卻感受到嚴重高碳低氮的碳氮不平衡，故合成過多的花青素累積。

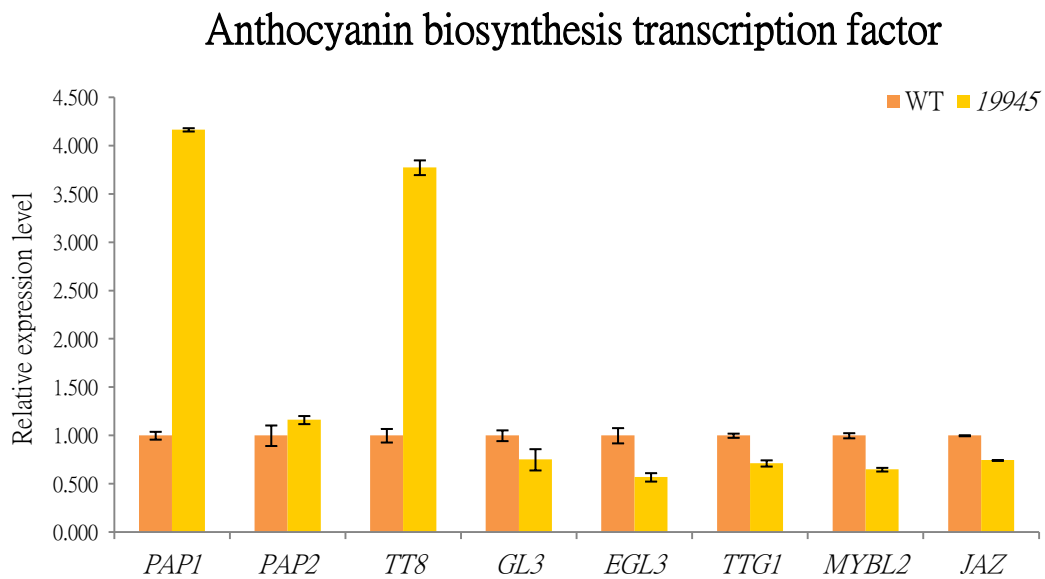
由此可知，*19945* 的突變基因 *HDA15* 在植株中扮演對抗碳氮不平衡逆境的重要角色。

五、即時定量聚合酶連鎖反應(qRT-PCR)，檢測花青素合成相關基因與轉錄因子表現量

(A)



(B)



圖二十八 檢測花青素合成相關基因及轉錄因子在 WT 及 19945 中的相對表現量

(平均±標準差，本實驗四重複，定 WT 的表現量為 1)。

植株生長條件：1/2 MS(-N)+5 mM Gln，生長天數十天。

(A)花青素合成相關基因相對表現量。

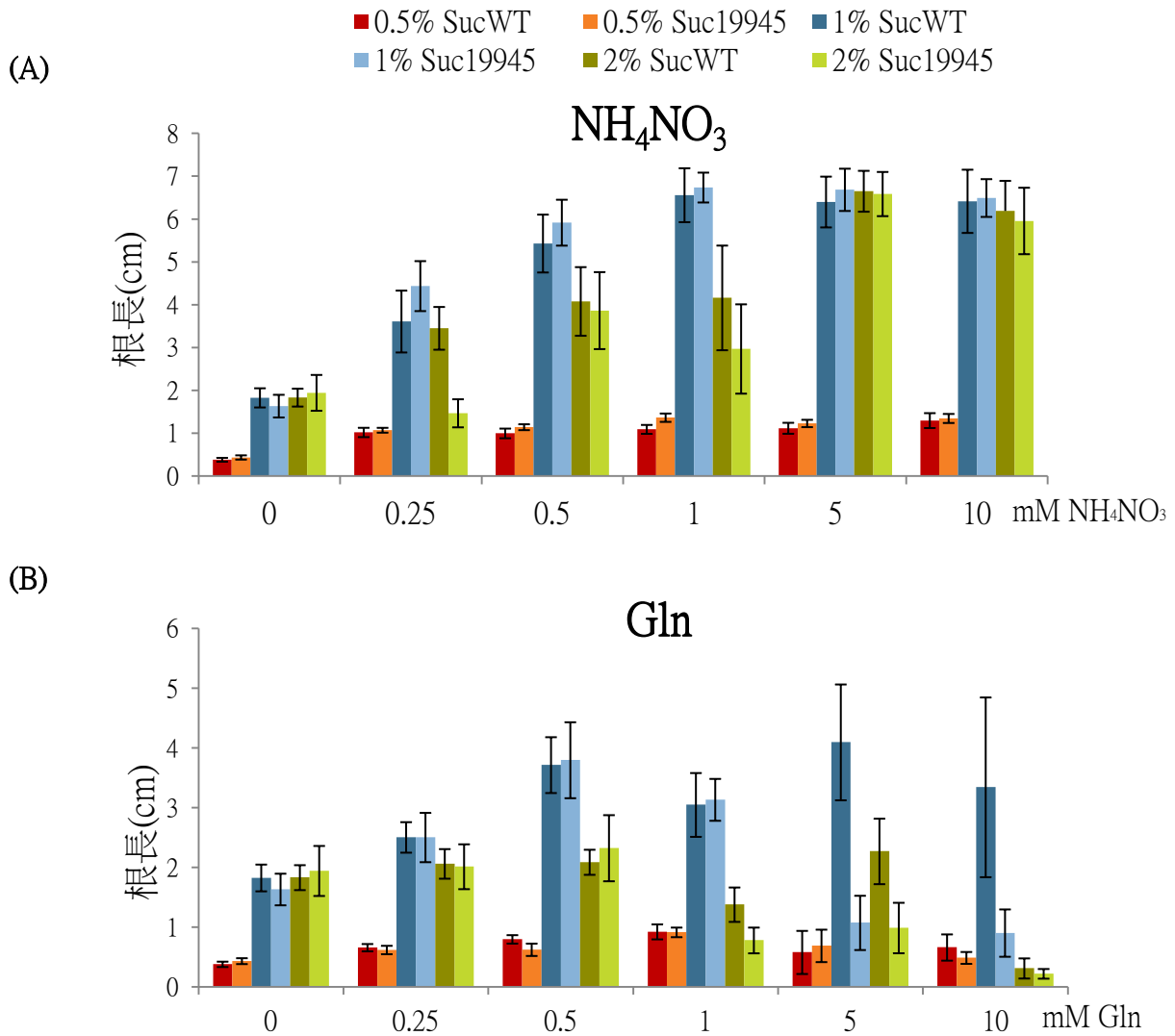
(B)花青素合成相關基因之轉錄因子相對表現量。

檢測花青素合成相關基因相對表現量(圖二十八 A)結果顯示：*19945*的花青素合成相關基因 *DFR*、*LDOX*、*UF3GT*的表現量有被過量誘導。其餘花青素合成基因 *PAL*、*C4H*、*4CL*、*CHS*、*CHI*、*F3H*、*F3'H*表現量在 WT 和 *19945* 中則無明顯差異。

測量花青素合成途徑相關轉錄因子表現量差異(圖二十八 B)結果顯示：只有 *PAP1*、*TT8* 在 *19945* 中有明顯被誘導的表現。其餘轉錄因子 *GL3*、*PAP2*、*EGL3*、*TTG1*、*MYBL2*、*JAZ* 表現量在 WT 和 *19945* 中則無明顯差異。

我們發現在花青素合成途徑中，只有合成基因 *DFR*、*LDOX*、*UF3GT*和轉錄因子 *PAP1*、*TT8*在 *19945* 中有明顯被誘導的表現。已知轉錄因子 *PAP1*、*TT8*能正調控花青素合成基因 *DFR*、*LDOX*、*UF3GT*的表現(Zhou et al., 2012)。所以我們推論 *19945* 的突變基因 *HDA15* 可以藉由抑制轉錄因子 *PAP1*、*TT8* 的表現，進而影響花青素合成基因 *DFR*、*LDOX*、*UF3GT* 的表現量。由於 *HDA15* 在 *19945* 中喪失功能，造成調控花青素合成的路徑失常，有花青素過度累積導致植株呈紫紅色的明顯性狀。

六、設計不同碳氮比生長培養基，觀察並量化 *19945* 是否有其他性狀



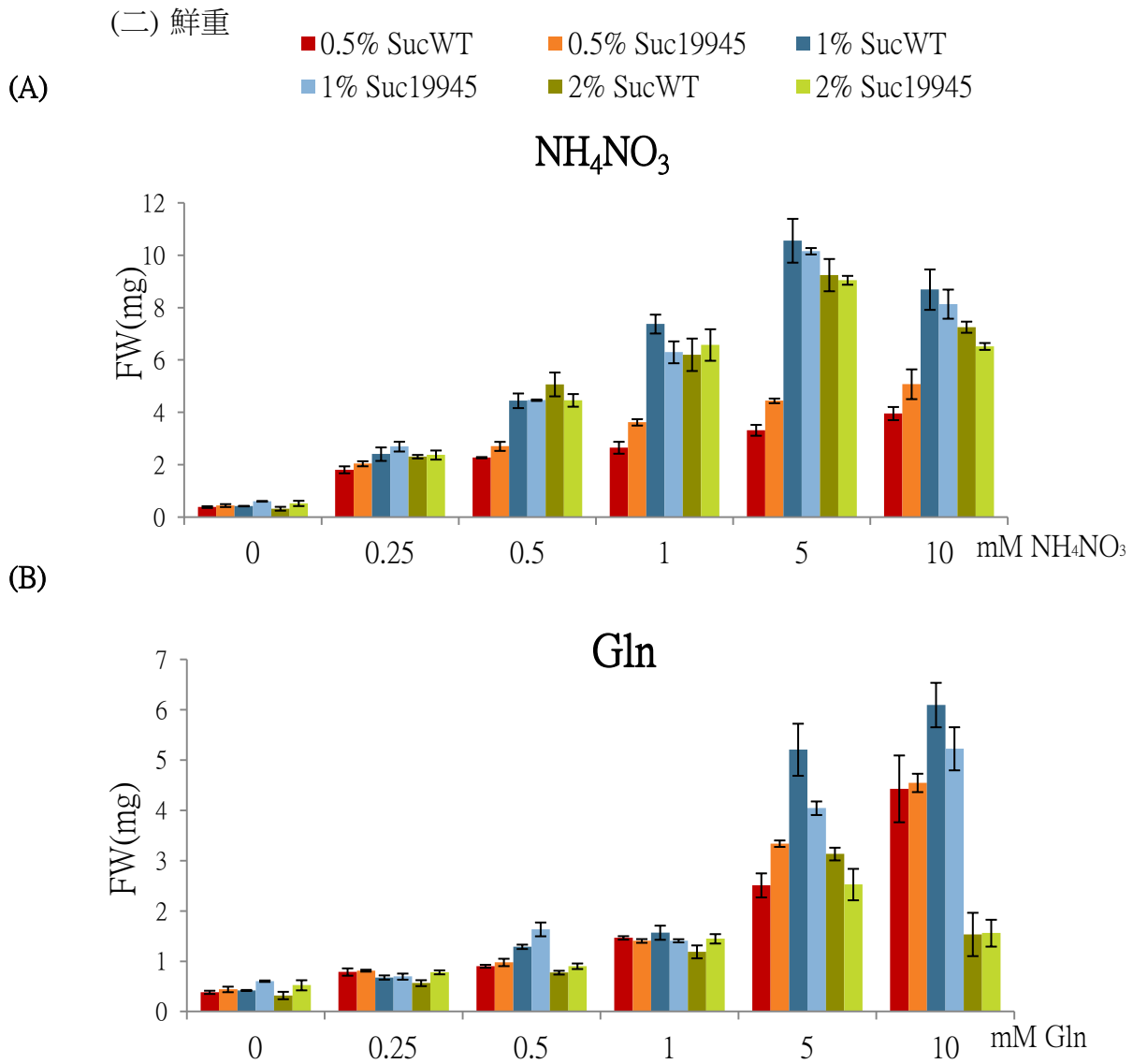
圖二十九 不同碳氮比下植株根長(平均±標準差，n=30)。生長天數十天。

橫軸為不同氮濃度，縱軸則是根長，單位 cm。

(A)以 NH₄NO₃作為氮源植株根長。

(B)以 Gln 作為氮源植株根長。

從測量植株根長的結果，可以看出以 NH₄NO₃作為唯一氮源的情況下(圖二十九 A)，*19945* 根長和 WT 無明顯差異。而以 Gln 作為唯一氮源的情況下(圖二十九 B)，當 5 mM Gln，Suc 濃度為 1%和 2%、10 mM Gln，Suc 濃度為 1%時，*19945* 根長會較 WT 短外(紅框處)，無明顯性狀差異。



圖三十 此表為不同碳氮比下植株鮮重(平均±標準差, n=44)。生長天數十天。

橫軸為不同氮濃度，縱軸則是鮮重，單位 mg。

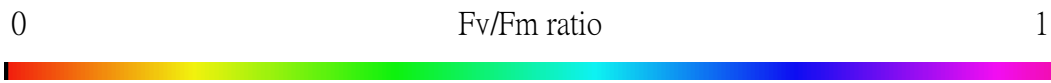
(A)以 NH_4NO_3 作為氮源植株鮮重。

(B)以 Gln 作為氮源植株鮮重。

從測量植株平均重的結果(圖三十)，可以看出以 NH_4NO_3 或 Gln 作為唯一氮源的情況下，19945 和 WT 並無明顯差異。

(三) 光合作用效率

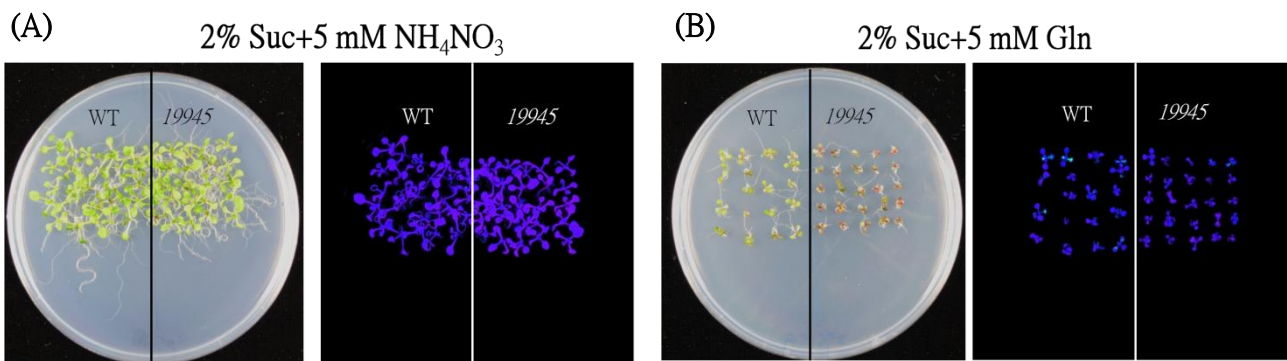
比較 19945 和 WT 在不同碳氮比生長環境下，Imaging Win 軟體轉換最大螢光參數值成不同顏色的對照表(圖三十一)，發現 19945 和 WT 光合作用效率並無明顯差異。



圖三十一 最大螢光參數影像色值對照表。

此為 Imaging Win 軟體將最大螢光參數值(0~1)轉換成不同顏色的對照表(由紅到粉)代表。比較經 Imaging Win 軟體處理後的植株照片顏色，若顏色相近，則表光合作用效率相當。

以 1/2 MS(-N)+2% Suc+5 mM NH₄NO₃ 舉例，WT 和 19945 兩者植株生長情形相近(圖三十三 A 左)，檢測光合作用效率時也無明顯差異(圖三十二 A 右)。而在以 1/2 MS(-N)+2% Suc+5 mM Gln 時，雖 19945 明顯因花青素導致植株呈紫紅色(圖三十二 B 左)，但檢驗光合作用效率結果與 WT 差異不大(圖三十三 B 右)，兩者轉換出的顏色皆為藍紫色，無達到明顯效率差異(如效率較差植株會呈黃橘色)。



圖三十二 植株光合作用效率檢測。

(A)生長條件：1/2 MS(-N)+2% Suc+5 mM NH₄NO₃。

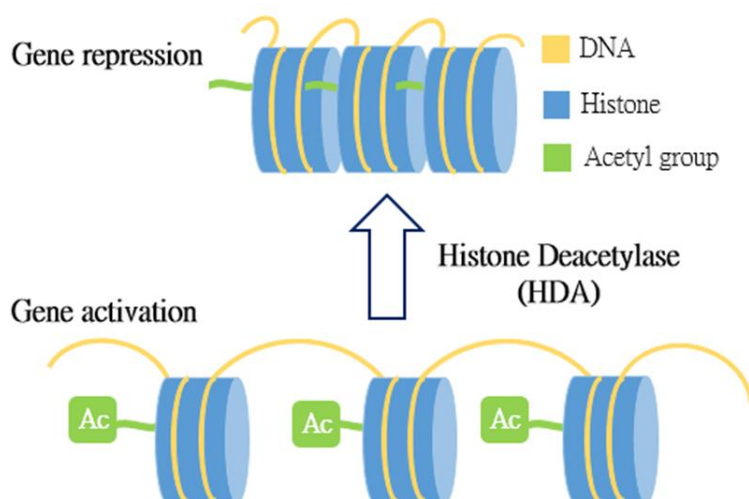
左：植株生長照片。右：經 Imaging Win 軟體處理後的最大螢光參數影像($F_m - F_0$)/ F_m 。

(B)生長條件：1/2 MS(-N)+2% Suc+5 mM Gln。

左：植株生長照片，右：經 Imaging Win 軟體處理後的最大螢光參數影像($F_m - F_0$)/ F_m 。

柒、 討論

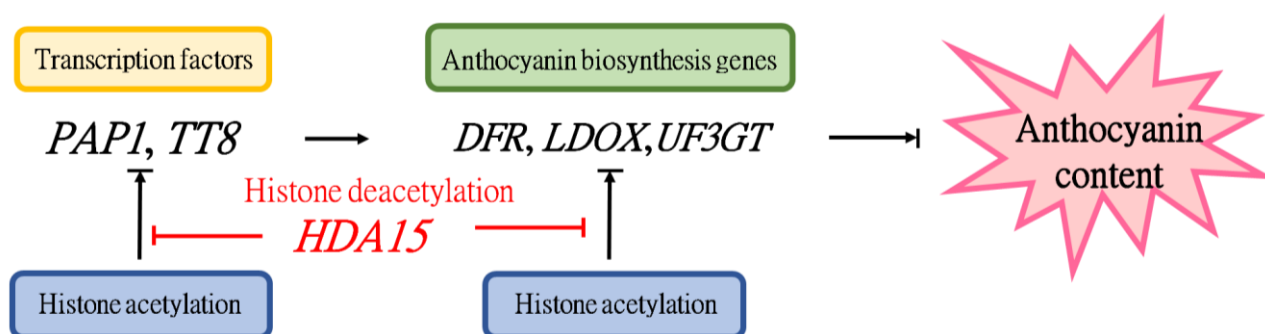
綜合以上六個實驗的實驗結果，*19945*的突變基因因為經 T-DNA 插入而失去功能的 *At3g18520*，其為 Class II 組蛋白去乙醯酶(Histone deacetylase, HDA)中的成員 HDA15。HDA 已知與染色體修飾有關，會藉由組蛋白的去乙醯化，增加 DNA 的纏繞程度，抑制基因轉錄(圖三十三)。(Malona, 2010) (Alinsug et al.,2012)



圖三十三 組蛋白去乙醯酶 (HDA)可切除組蛋白上的乙醯基，增加 DNA 的纏繞程度，抑制基因轉錄。

我們推論在高碳低氮，碳氮不平衡的情況下，*19945*經 T-DNA 插入的 *HDA15* 毀損，導致 *HDA15* 無法藉由組蛋白去乙醯化抑制花青素合成途徑中轉錄因子 *PAP1*、*TT8* 的表現量(圖二十八 B)，使其過度誘導花青素合成基因 *DFR*、*LDOX*、*UF3GT*(圖二十八 A)，進而造成 *19945* 花青素的過度累積。

因此，我們建立出 *HDA15* 在正常植株中影響花青素合成的機制為：高碳低氮，碳氮不平衡時，*HDA15* 會透過染色體修飾，抑制轉錄因子 *PAP1*、*TT8*，進而影響花青素合成基因 *DFR*、*LDOX*、*UF3GT* 表現來調控植株花青素的合成。(圖三十四)



圖三十四 碳氮不平衡(C>>N)下，*HDA15* 在正常植株中影響花青素合成的機制。

捌、 結論

- 一、阿拉伯芥突變株 *19945* 由於 T-DNA 插入造成 *HDA15*(*At3g18520*)無法表現。
- 二、*HDA15* 是組蛋白去乙醯酶(histone deacetylase)，可透過染色體修飾影響轉錄因子 *PAP1*、*TT8*，調節花青素的合成基因 *DFR*、*LDOX*、*UF3GT*的表現。
- 三、當 *19945* 面臨碳氮不平衡的逆境時，由於 *HDA15*的缺失，導致 *19945* 在高碳逆境下產生花青素過度累積的性狀。

玖、 未來展望

- 一、檢測其他碳氮比下花青素合成途徑基因與其轉錄因子表現量，進而推測 *HDA15* 在碳氮平衡時與花青素合成途徑的關聯。
- 二、測量花青素合成途徑基因 *DFR*、*LDOX*、*UF3GT*與轉錄因子 *PAP1*、*TT8*的乙醯化程度，驗證 *HDA15* 透過染色體修飾，使組蛋白去乙醯化來調控花青素合成的機制。

拾、 參考資料

- 劉敏莉 (2012)。葉綠素螢光在作物耐熱性篩選之應用。高雄區農業改良場研究彙報，21(1)，1-15。
- Alinsug, M.V. (2010). Functional studies of class II and IV histone deacetylases in Arabidopsis. Institute of Plant Biology, NTU.
- Alinsug, M.V., Chen, F.F., Luo, M., Tai, R., Jiang, L. & Wu, K. (2012). Subcellular Localization of Class II HDAs in Arabidopsis thaliana: Nucleocytoplasmic Shuttling of HDA15 Is Driven by Light. PLoS ONE, 7(2).
- Kan, C.C., Chung, T.Y., Juo, Y.A. & Hsieh, M.H. (2015). Glutamine rapidly induces the expression of key transcription factor genes involved in nitrogen and stress responses in rice roots. BMC Genomics, 16(1), 731.
- Peng, M., Hudson, D., Schofield, A., Tsao, R., Yang, R., Gu, H., Bi, Y. & Rothstein, S.J. (2008). Adaptation of Arabidopsis to nitrogen limitation involves induction of anthocyanin synthesis which is controlled by the NLA gene. Journal of Experimental Botany, 59(11), 2933 – 2944.
- Solfanelli, C., Poggi, A., Loreti, E., Alpi, A. & Perata, P. (2006). Sucrose-Specific Induction of the Anthocyanin Biosynthetic Pathway in Arabidopsis. Plant Physiology, 140, 637-646.
- Zhou, L.L., Shi, M.Z. & Xie, D.Y. (2012). Regulation of anthocyanin biosynthesis by nitrogen in

拾壹、 附錄

Map-based cloning		genotyping	
編號	序列	編號	序列
Mon 1-3	CAAGCCTATGTGAAACACGA	SP1(<i>At3g18520</i> -F)	ATGGTTGTAGAAACTATCGA
Mon 1-4	CGGTGGAGTTAGTCGGATAC	SP7(<i>At3g18520</i> -R)	TTGCATTGATAGGCAAGCAT
Mon 1-5	CCTCTGTAGCTCACTCTAC	RT-PCR	
Mon 1-6	GAGTGGGACCCAGAGATTTG	編號	序列
Mon 1-7	ACTTCCGAATACGATGTCCG	PD1(T-DNA)	GCATGCAAGCTTGGCACTGG
Mon 1-8	GGATTTCTTCTCGCGTGATG	PD2 (T-DNA)	TGAGACCTCAATTGCGAGC
Mon 1-9	GGGATATACGTATGCTGATG	PD3(T-DNA)	TCGGGCCTAACTTTTGGTG
Mon 1-10	TTTCCTTCGTACAATCCTCC	qRT-PCR(anthocyanin gene)	
Mon 1-15	AAATGCTCACATACGTGGAG	編號	序列
Mon 1-16	TCCTCTGGTTGTTTTGAGTG	<i>PAL</i> -F	GGAGGAGCTTAAGGCAGTGCTA
Mon 2-1	GCCTTGGTGAATCATACTC	<i>PAL</i> -R	GCTGCTCTTGCTGCTCCAC
Mon 2-2	ACTTTGGGAATGAGAATCG	<i>CHH</i> -F	CCCAGCAGAAAGCAAATCCT
Mon 2-7	GGTTCCTCGTATACACGAAG	<i>CHH</i> -R	GGGTTGTTTGCTAGCCACCA
Mon 2-8	ATCTCCAACCACCATGATAC	<i>4CL</i> -F	ACGTTTCTCAGGGTGTTCAT
Mon 2-9	GTTTCGGTTGACATTTGCAC	<i>4CL</i> -R	CTTCCCCATATTTCTCATCAGGA
Mon 2-10	ACATGCGCATCAAACAAAGG	<i>CHS</i> -F	AGCTGATGGACCTGCAGGCATCTTGGC
Mon 2-21	GCTGACCCGTGAGTATCAAC	<i>CHS</i> -R	TGCATGTGACGTTTCCGAATTGTCGAC
Mon 2-22	CAACAATCTGACTGCAGTCG	<i>CHI</i> -F	ATGTCTTCATCCAACGCCTGCGCC
Mon 3-5	TCTAGTGGT GTCCATGTAC	<i>CHI</i> -R	GACGGTGAAGATCAGAAATTTACC
Mon 3-6	GTTCTACTACCTTGAGGAGA	<i>F3H</i> -F	ATGGCTCCAGGAACCTTGACTGAGCTA
Mon 3-19	AGGAACTTTGCACGTTGTGG	<i>F3H</i> -R	GATCTGACGGCAGATCTCTCCTCTTTT
Mon 3-20	AGAGTGACCAAATCTGAACC	<i>F3H</i> -F	GTTGAGAAAGATTAGTTCTGTTCATCT
Mon 3-23	TGGTCGTGACCATCTTCTTG	<i>F3H</i> -R	GTTGACTACACACATGTTCAACCACTG
Mon 3-24	GGTCACAAGATGTCTTGTGG	<i>DFR</i> -F	ATGGTTAGTCAGAAAGAGACCGTGTGTG
Mon 3-31	TGAGCAATGATGGTTAGCAG	<i>DFR</i> -R	CGTTTCGCAAATCAAGAAGATGTTGTAC
Mon 3-32	AATCCGTCAAAGCTGTCCG	<i>LDOX</i> -F	CATCGTGGGTTGGTGAATAA
Mon 3-39	GGCTTTAGGGTTCTTGTCC	<i>LDOX</i> -R	GTCCGTGGAGGAAACTTAGC
Mon 3-40	CGTTTTGTCCGGAGTTGAGG	<i>UF3GT</i> -F	ATGGAGGTGGCGTTGAAG
Mon 4-3	TCAATGTATACAGGAGGGCG	<i>UF3GT</i> -R	CCGCGAGAACCACCCTTT
Mon 4-4	TGGTAGCTGTTCCGAATAGG	qRT-PCR(anthocyanin transcription factor)	

		編號	序列
Mon 4-5	AGAGAAACCAAAGAACGGAG		
Mon 4-6	TTCTCGTCTATCTCGTGCAG	<i>PAP1-F</i>	CTGAAGCGACGACAACAGAAAA
Mon 4-7	TAACGTCCCTTGTAGTGATC	<i>PAP1-R</i>	GATCAACGTCAAAAGCCAAGGT
Mon 4-8	ATCGTGACCTGGAGTGATGG	<i>PAP2-F</i>	CTGAAGCGACGACAGCTGAAC
Mon 4-9	AGGCAAGTGAATCAACCGTG	<i>PAP2-R</i>	GCTCAACGTCAAACGCCAA
Mon 4-10	TGCATGCATTGATTTCCGTC	<i>TT8-F</i>	GCGGAGATAAGGGCGAAAGT
Mon 4-11	TGAGATGCAAGGTTGTAGGG	<i>TT8-R</i>	GACCTCAGCGATGCTTGCTT
Mon 4-12	TGATCCCTAGTTCCTTACAG	<i>GL3-F</i>	AGCAGATACCGGTTTTACTGGTTT
Mon 5-17	TCTACATTGGTCAGATTCAG	<i>GL3-R</i>	AACGAACCGATCCTTAAATTATCG
Mon 5-18	CATTTGGTCCAGTAGTAAGC	<i>EGL3-F</i>	AGGAAAGAGCATCAGCGAATTG
Mon 5-19	CTCAGTTGTCTGATTGAGA	<i>EGL3-R</i>	CATCACTCCCCTTCCTTTTGC
Mon 5-20	GTCTTCCTTTTACATCTAG	<i>TTG1-F</i>	CATGTGCGTAAGTAGGTTTGGTTT
Mon 5-21	CAAGAATTGAGCATAATCCG	<i>TTG1-R</i>	TGCGGACCTAAAAGCGAGAG
Mon 5-22	ATCCGACTGTGATTGGACCC	<i>MYBL2-F</i>	CCTTCAGGACTCTAGCGAATCC
Mon 5-29	ATGAGTTCTCTCTATTGGGC	<i>MYBL2-R</i>	GTTTCTTGACCTGTTGAACCATTG
Mon 5-30	GATGCCAAAAGGTGCGTATC	<i>JAZ-F</i>	GGCTCGGTTTAGCAGCTGAA
Mon 5-35	AGACAAGAACCACATGAGAG	<i>JAZ-R</i>	GGTACG GCTTGAGGGTGGTTA
Mon 5-36	GTACGTACGTCTTTCGCGAG		

【評語】 052108

1. 本研究有效地利用最新的技術探討碳、氮平衡的調控，瞭解新的花青素調控機制。
2. 實驗設計與方法符合科學精神
3. 團隊成員對相關知識背景之瞭解性亦佳。