

中華民國第 63 屆中小學科學展覽會  
作品說明書

---

高中組 植物學科

佳作

052104

鹼稻「丐一尢」？——探討水稻在鹼性環境下的  
生長差異與基因表現

學校名稱：國立中央大學附屬中壢高級中學

作者：  高二 郭來典  高二 許詠森	指導老師：  楊尚達  童婉萍
---------------------------------	-----------------------------

關鍵詞：水稻、鹼性逆境、OsGRFs 基因

## 摘要

氣候變遷導致土壤鹽鹼化，影響作物生長，本研究探討鹼化對水稻的影響，觀察兩種水稻品系在不同 pH 值培養基下，地上、地下部生長數值，及轉錄因子 *OsGRF1*、*3*、*7* 基因表現差異。結果水稻在 pH 11 處理下生長較差，顯示耐鹽的 TNG67 及鹽敏感的 NB 水稻在高鹼環境中生長皆被抑制。此外，在 pH 5、7、9 及 11 中兩品系水稻葉綠素含量沒有統計的顯著差異。在基因表現上，TNG67 水稻之 *OsGRF1* mRNA 表現量高可能是導致其生長較高的主因，*OsGRF3* 的表現幾乎不受影響，*OsGRF7* 的表現量在兩品系中均在 pH 7 時有最大值，以上結果暗示 *OsGRF1* 在 pH 5~9 與 TNG67 地上部生長呈正相關。

## 壹、前言

### 一、研究動機

在選修生物 II 之「植物逆境與防禦」單元中，提到植物在不同的逆境環境之下會有不同的生理表現，其中土壤鹽鹼化是植物遭遇的逆境之一。近年來，土壤鹽鹼化越來越嚴重，造成全球糧食產量減少，且隨著生態環境的惡化和人為因素的干擾，鹽鹼化土地面積逐漸增加，問題日益嚴重。鹽鹼化對植物造成的衝擊可分為高鹽度逆境和高鹼度逆境來探討，在生物課時，有學過鹽分逆境中，高濃度的鈉離子會造成植物細胞膜異常，並抑制酵素活性而導致代謝異常，是影響植物生長的重要因素。這讓我們很好奇：若除去鈉離子的影響，在鹽鹼化中的「鹼」會對植物造成什麼影響呢？因此，我們想設計實驗來探討這個問題。水稻為國人的主食，也是重要的經濟作物，故我們選擇水稻作為我們的研究對象。

前人研究曾指出一般的土壤 pH 值範圍落在 3~11 之間 (謝元德等, 1998), 部分土壤 pH 值達強鹼的狀態; 而在台灣土壤的研究中, 臨海地區和花東縱谷地區土壤呈鹼性。以臨海地區來看, 愈靠近海邊土壤 pH 值愈高, 推測可能是颱風帶來的狂風暴雨及海水倒灌讓土壤受到海水浸潤的影響 (張瑀芳、蔡呈奇, 2009)。在雲林縣沿海的麥寮鄉和台西鄉, 土壤 pH 值範圍落在 7.02~8.34 之間, 偏弱鹼性 (吳美瑩, 2017)。又如南澳溪的出海口, 雖然此處地勢較高, 表層 (0~25 cm) 的土壤 pH 值並未達 8.5 以上, 但是在 25~50 cm 的土層中出現 pH 8.7 (張瑀芳、蔡呈奇, 2009)。以不臨海的花東縱谷來看, 花東縱谷靠中央山脈側的土壤, 因有中央山脈的片岩沖積物, 富含石灰質因而酸鹼值較高 (陳吉村, 2015), pH 值可高於 8.0 (謝元德等, 1998)。綜合以上文獻資料, 本研究針對 10 天大的水稻幼苗在 pH 值 8~11 的生長狀況進行探究。

在植物的鹼性逆境研究中, 環境的高 pH 值會引發細胞的改變, 而基因的表現對植物所發生的生長變化扮演重要角色。我們也好奇鹼性處理會影響哪些水稻生長與發育的基因, 在查詢相關論文後, 發現許多水稻幼苗的研究常常提到 OsGRFs (Rice Growth-Regulating Factor) 基因家族, OsGRFs 是一群調節水稻生長相關基因表現的轉錄因子蛋白 (Transcription Factor), 會優先在年輕和生長的組織中表現 (Choi et al., 2004)。其中, *OsGRF1* 在吉貝素誘導的深水水稻節間伸長過程中表現量會增加, 但在雙子葉模式植物的阿拉伯芥中表現時會導致莖長的嚴重抑制 (Choi et al., 2004)。*OsGRF3* 是另一個 OsGRFs 基因家族的成員, 當其以 RNA 干擾而無法表現時, 會導致水稻無法長高 (Kuijt et al., 2014)。*OsGRF7* 可以調節水稻中的生長素和吉貝素代謝, 對水稻葉角和分蘗數有影響 (Chen et al., 2020)。綜合以上文獻資料, 我們分別選了 *OsGRF1*、*OsGRF3*、*OsGRF7* 作為我們主要觀察 pH 值變化下水稻幼苗的基因表現, 以了解不同 pH 值環境影響的水稻, 是否會有這三個轉錄因子蛋白基因表現量上的差異。

## 二、研究目的

- (一) 探討水稻在鹼性環境下, 10 天大幼苗的地上部的生長狀況及葉綠素含量。
- (二) 探討水稻在鹼性環境下, 10 天大幼苗地下部的生長狀況。
- (三) 探討水稻在鹼性環境下, 10 天大幼苗 OsGRFs 基因的 mRNA 表現量。

## 貳、研究設備及器材

### 一、實驗室儀器

表 1、實驗室儀器

分光光度計	多段式旋轉震盪混和器	恆溫乾浴器	高速冷凍離心機
烘箱	高壓滅菌釜	植物生長箱	無菌操作台
電泳槽	微波爐	微量分光光度計	試管震盪器
電磁攪拌器	聚合酶連鎖反應儀	酸鹼度計	UV 光膠體攝影機

### 二、實驗室器材

表 2、實驗室器材

0.2 ml 離心管	1.5 ml 離心管	50 ml 離心管	打火機
刮勺	研鉢與杵	拭鏡紙	透氣膠帶
電子秤	微量吸管	微量吸管尖	滅菌膠帶
試管架	鋁箔紙	標籤紙	燒杯
醬瓜瓶	攪拌子	鑷子	

### 三、實驗藥品

#### (一)培養基製作

½ MS salt、1NKOH、99.7%醋酸、蔗糖、Agar、MS-vitamin、RO water

#### (二)種子組織培養

漂白水、Polyoxyethylene、RO water

#### (三)萃取葉綠素

95%酒精、液態氮

#### (四)萃取 mRNA、製作 cDNA、利用 PCR 增大 OsGRFs 與 *OsActin1* 的 cDNA

1.PCR 核酸引子：除了目標基因 OsGRFs 外，也用了 *OsActin1* 作為對照基因。*OsActin1* 被視為水稻的管家基因，理論上不管在何種環境下都能穩定的表現，因此可以作為組間比較時校正的參考。本實驗所使用的 OsGRFs 基因之引子序列相關資訊如表 3 所示。

表 3、本實驗所使用的 DNA 核酸引子資訊

基因	引子名稱	長度	Tm 值	序列	bp
<i>OsGRF1</i>	<i>OsGRF1 Fw</i>	20	58	CATGAGAAGAACAGCAAGGG	274
	<i>OsGRF1 Rv</i>	20	57	ATTCATCATTGTGGTAGCGG	
<i>OsGRF3</i>	<i>OsGRF3 Fw</i>	20	58	AGTTTCGAGCTACCCTATGC	102
	<i>OsGRF3 Rv</i>	20	58	CTCCCGAAGAATGACAATGG	
<i>OsGRF7</i>	<i>OsGRF7 Fw</i>	21	57	AAAACCTTGGCTACTAACAGG	135
	<i>OsGRF7 Rv</i>	20	58	TGAGGACATCTCTTCAGACC	
<i>OsActin1</i>	<i>OsActin1 Fw</i>	21	55	AGACCTTCAACACCCCTGCTA	290
	<i>OsActin1 Rv</i>	21	55	CAGGGCGATGTAGGAAAGCTT	

註：資料引用自 Eric Kimani Kuria, 2017 及 Yamei Ma et al., 2017

#### 2.其他藥品

100 bp DNA Ladder、10 mM dNTP、10X Fast RT Buffer、10X MOPS、10X PCR buffer、1X TAE buffer、5X genomic DNA Eraser、6X Gel loading dye、Agarose、Chloroform、CTAB、DEPC water、EtBr、formaldehyde、formamide、Isopropyl alcohol (IPA)、mercaptoethanol、Phenol Chloroform、RNase-Free ddH<sub>2</sub>O、RT Enzyme Mix、RT Primer Mix、ZymTaq

#### 四、種子介紹

我們實驗選定的水稻品系為台農 67 號 (簡稱 TNG67)以及 Nipponbare 水稻種子 (簡稱 NB)，兩者均是科學研究上常用的水稻品系。台農 67 號強悍、不易倒伏、適合機械收穫、具有穩定高產潛力、適應性廣、對病蟲害之忍耐性強 (黃真生等, 2012)。台農 67 號水稻對光週期不敏感，具有許多優良的農藝特性，是在台灣育種計劃和科學研究中最常使用的水稻品系 (Hour et al., 2007)，此外台農 67 號對鹽逆境有比較好的耐性效果 (楊藝瑋, 2015)。和台農 67 號同樣是梗稻的 Nipponbare (日本晴；NB)則是國際間最具代表性的梗稻品系，目前其遺傳組 DNA (genomic DNA) 已經被完整的定序，成為主要穀類作物多樣性的參考序列 (Matsumoto et al., 2016)，NB 對高鹽度環境刺激較敏感 (Ferdose et al., 2009)。由於這兩種品系水稻在文獻上的耐鹽程度不同，因此在除去鈉離子的影響，在鹽鹼化中的「鹼」會對這兩種品系水稻造成什麼影響呢？是否這兩種品系水稻對 pH 值也有不同的敏感度？因此本研究選用這兩種品系的水稻進行探討。

## 參、研究過程及方法

### 一、實驗架構

將二品系的水稻種子分別放置於 pH 5、pH 7、pH 9、pH 11 的培養基中，其中 pH 5 與 pH 7 分別為酸性與中性的相互對照組。待水稻生長 10 天後，測量植株各項生長數值、葉綠素含量、mRNA 表現量，分析完數據後將實驗結果繪製成統計圖以進行比較 (圖 1)。

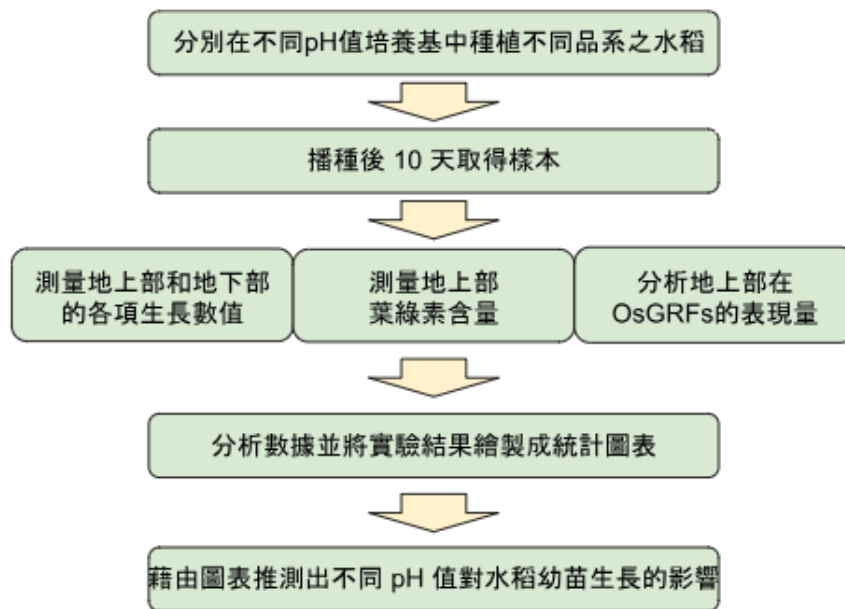


圖 1、主要實驗流程圖

## 二、研究方法

### (一)培養基製作

1. 將 700 ml RO water、2.15 g ½ MS salt、30 g 蔗糖、500 µl MS-vitamin 裝入燒杯中，再加入 RO water 至 1000 ml，放入磁攪拌子進行攪拌至無沉澱。
2. 分裝量杯中 500 ml 溶液至不同的燒杯，並持續進行攪拌。
3. 取出酸鹼度計電極測量溶液初始 pH 值。
4. 利用微量吸管吸取 100 µl 1NKOH 溶液加入燒杯中，重複加入 1NKOH 溶液直到實驗所需的 pH 值，若是配置 pH 5 之培養基，則使用 99.7%醋酸 (以上步驟重複 3 次，配得 pH 5、pH 7、pH 9、pH 11 溶液)。
5. 不同 pH 值溶液分別加入 8 g Agar，並加熱、攪拌直到 Agar 完全溶解。
6. 將不同 pH 值的 500 ml 培養基溶液各自平均分裝至 5 個醬瓜瓶中(每個 pH 值會有 5 瓶，共計實驗 25 瓶)。
7. 利用高壓滅菌釜進行高壓蒸氣滅菌 (3100 kg/m<sup>2</sup>, 121°C)，待滅菌後的培養基溶液冷卻凝結後，即可進行種子種植的步驟。

### (二)種子組織培養

1. 將所有種植種子會使用到的器具進行消毒，並放置於無菌操作台。
2. 剝除兩品系水稻種子的外殼，並配置 15 ml 漂白水、15 ml RO water 和 2 滴 Polyoxyethylene 清洗溶液。
3. 取 50 ml 離心管加入水稻種子和清洗液，並放入多段式旋轉震盪混和器中進行清洗 (設定模式為 C1，轉速為 90，持續 30 分鐘)。
4. 於無菌操作台將 6 顆水稻種子放入以滅菌之醬瓜瓶，將水稻種子均勻分布並壓入培養基中，蓋上蓋 (重複此步驟將兩品系的水稻種子種植於含有不同 pH 值培養基的醬瓜瓶中)。
5. 待所有水稻種子皆種植完畢後，用透氣膠帶沿瓶口處貼一圈以固定瓶蓋，在醬瓜瓶上標記種植日期、品系、pH 值之標籤紙。
6. 將所有的醬瓜瓶置於植物生長箱 (24 小時光照、恆溫 28°C、濕度 70%RH)。



### (三)測量水稻幼苗發芽率、地上部與地下部生長狀況

- 1.待水稻種子生長至第 3 天、第 7 天、第 10 天時，進行水稻幼苗的拍照並方便比對。
- 2.在水稻種子生長至第 10 天後，取出水稻幼苗並使用直尺測量植株的地上部長度以及地下部最長根長、根總長和總根數 (圖 2)。

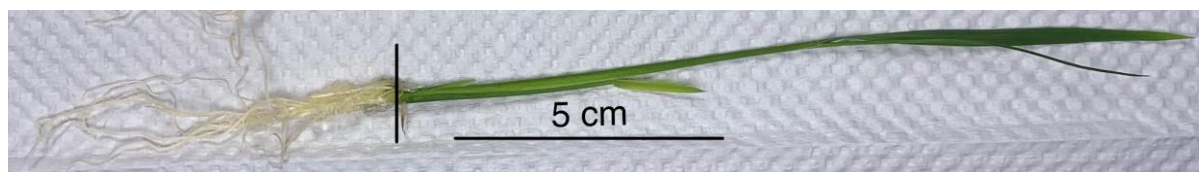


圖 2、10 天大水稻幼苗地上部和地下部測量範圍示意圖。10 天大水稻幼苗，直線代表地上部及地下部之分隔線，橫線代表 5 cm 之比例尺。

### (四)測定 10 天大水稻幼苗之葉綠素含量多寡

1. 取 10 天大水稻幼苗的地上部使用電子秤測量其重量。
2. 利用鋁箔紙包住 10 天大水稻幼苗的地上部，放入液態氮中將其研磨成粉末狀。
3. 磨碎之粉末加入裝有 95%酒精的 1.5 ml 離心管中，利用試管震盪器將其混合均勻。
4. 將離心管置於 4°C 冰箱 30 分鐘，並於冰箱中進行離心 (13200 rpm x 20 分鐘)。
5. 使用微量吸管吸取上清液，並放入新的 1.5 ml 離心管。
6. 利用分光光度計 (設定測量  $\lambda$  649 和  $\lambda$  665) 測量待測溶液之葉綠素 a、b 濃度。
7. 帶入公式進行葉綠素含量的計算 (林佳瑩，2014)。

$$\text{葉綠素 a 的濃度 (Ca)} = 13.95 * A_{665} - 6.88 * A_{649}$$

$$\text{葉綠素 b 的濃度 (Cb)} = 24.96 * A_{649} - 7.32 * A_{665}$$

$$\text{總葉綠素濃度} = Ca + Cb$$

$$\text{葉綠素含量} = [\text{葉綠素的濃度} * \text{提取液體積} * \text{稀釋倍數}] / \text{樣品鮮重}$$

(五)測量 10 天大水稻幼苗之 mRNA 表現量

10 天大水稻幼苗之 mRNA 表現量的整體操作流程如圖 3 所示：

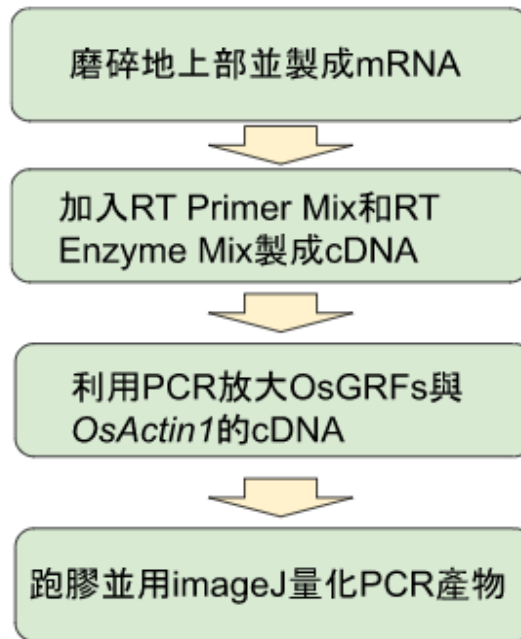


圖 3、測量 10 天大水稻幼苗 mRNA 表現量的流程圖

## 1. 萃取 RNA

- (1).利用鋁箔紙包住 10 天大水稻幼苗的地上部，並放入液態氮中。
- (2).取 750  $\mu$ l CTAB 和 15  $\mu$ l mercaptoethanol 加入 1.5 ml 離心管，放入恆溫乾浴器 (65°C、5 分鐘) 備用。
- (3).利用經高溫滅菌 (200°C、4 小時) 的研鉢與杵在液態氮中將 10 天大水稻幼苗的地上部研磨成粉末狀。
- (4).將磨成粉末狀的樣本加入在恆溫乾浴器備用的 1.5 ml 離心管中，搖晃均勻混合後再加入 750  $\mu$ l Phenol-chloroform，並於 4°C 冰箱中離心 (13200 rpm x 20 分鐘)。
- (5).取出上清液，再加入 750  $\mu$ l Phenol-chloroform，搖晃均勻混合後於 4°C 冰箱中離心 (13200 rpm x 20 分鐘)，並重複 2 次。
- (6).取出上清液，再加入 750  $\mu$ l Chloroform，搖晃均勻混合後於 4°C 冰箱中離心 (13200 rpm x 20 分鐘)，並重複 2 次。
- (7).取出上清液，再加入上清液體積一半的 IPA，搖晃均勻混合後於 4°C 冰箱中離心 (13200 rpm x 20 分鐘)。
- (8).倒除離心管上清液後加入 1000  $\mu$ l 75%酒精，並利用微量吸量管吸吐 75%酒精將沉澱物從底部衝上來，接著於 4°C 冰箱中離心 (13200 rpm x 20 分鐘)。
- (9).倒除離心管上清液後加入 1000  $\mu$ l 95%酒精，並利用微量吸量管吸吐 95%酒精將沉澱物從底部衝上來，接著於 4°C 冰箱中離心 (13200 rpm x 20 分鐘)。
- (10).倒除離心管上清液後，將離心管倒置晾乾，再加入 10  $\mu$ l DEPC water，用手指彈離心管，直至沉澱物完全溶於 DEPC water。
- (11).利用微量分光光度計測量 A260/A280 數值、A260/A230 數值。若 A260/A280 數值大於 1.9 時，代表蛋白質對 RNA 沒有影響；若 A260/A230 數值大於 2 時，代表鹽類、酚類、醣類對 RNA 沒有影響，則可繼續實驗。
- (12).利用微量分光光度計測量 RNA 的濃度，將單位換算為 ( $\mu$ g/ $\mu$ l)，再除以 1000  $\mu$ l 得出 RNA 要加的  $\mu$ l 數。
- (13).取 0.2 ml 離心管並加入 5  $\mu$ l formamide、1.77  $\mu$ l formaldehyde、1 $\mu$ l 10X MOPS、0.0625  $\mu$ l EtBr、1  $\mu$ g RNA 製成跑膠樣本以確保 RNA 的品質。
- (14).取 17.3  $\mu$ l DEPC water、0.24 g Agarose、2 ml 10X MOPS 加入玻璃罐中，並利用微波爐微波至 Agarose 完全溶解。
- (15).上步驟溶液再加入 0.6233 ml formaldehyde 後，快速倒入小格列膠台並插入尺梳，靜待 40 分鐘。

(16).利用微量吸量管將 RNA 樣本放入膠體的凹槽中並放入電泳槽，以 10X MOPS 沒過膠體即可進行 25 分鐘的跑膠。

(17).膠體在 UV 燈下拍照，使用不同曝光時間調整亮度直到清晰。

## 2.製作 cDNA

(1).取 0.2 ml 離心管並加入 (8 - 2  $\mu$ g RNA 用量) ml 的 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O、2  $\mu$ l 5X genomic DNA Eraser、2  $\mu$ g RNA，將其放入聚合酶連鎖反應儀 42°C 3 分鐘。

(2)再加入 5  $\mu$ l RNase-Free ddH<sub>2</sub>O、2  $\mu$ l 10X Fast RT Buffer、2  $\mu$ l RT Primer Mix、1  $\mu$ l RT Enzyme Mix，將其放入聚合酶連鎖反應儀 42°C 15 分鐘、95°C 3 分鐘。

## 3.利用 PCR 增大 OsGRFs 與 *OsActin1* 的 cDNA

(1).調配 OsGRFs condition 及 *OsActin1* condition 的 PCR 溶液。

*OsActin1* condition：

取離心管加入 6  $\mu$ l DEPC water、1  $\mu$ l 10X PCR buffer、0.5  $\mu$ l *OsActin1* Fw 引子、0.5  $\mu$ l *OsActin1* Rv 引子、0.5  $\mu$ l 10mM dNTP、0.5  $\mu$ l ZymTaq、1  $\mu$ l cDNA，進行離心以均勻混合。

OsGRFs condition：

取離心管加入 7.2  $\mu$ l DEPC water、1  $\mu$ l 10X PCR buffer、0.2  $\mu$ l OsGRFs Fw 引子、0.2  $\mu$ l OsGRFs Rv 引子、0.2  $\mu$ l 10mM dNTP、0.1  $\mu$ l ZymTaq、1  $\mu$ l cDNA，進行離心以均勻混合。

(2).依照引子 (primer) 設定聚合酶連鎖反應儀的反應條件。

*OsActin1* condition：

95°C 5 分鐘、94°C 15 秒 (30 次)、55°C (T<sub>m</sub> 值) 30 秒、72°C 30 秒、72°C 5 分鐘、16°C 無限。

OsGRFs condition：

95°C 5 分鐘、95°C 15 秒 (28 次)、60°C (T<sub>m</sub> 值) 30 秒、72°C 30 秒、72°C 5 分鐘、10°C 無限。

#### 4.跑膠並量化 PCR 產物

- (1).取 0.2 ml 離心管加入 2.5  $\mu$ l marker (100 bp DNA Ladder)、2  $\mu$ l 6XGel loading dye，離心均勻混合放著備用。
- (2).取 20 ml 1X TAE buffer、0.4 g Agarose 加入玻璃罐中，並利用微波爐微波至 Agarose 完全溶解，快速倒入小格列膠台並插入尺梳，靜待 40 分鐘。
- (3).利用微量吸量管將 cDNA 樣本和 marker 放入膠體的凹槽中並放入電泳槽，以 1X TAE buffer 沒過膠體即可進行 25 分鐘的跑膠。
- (4).跑完的膠體放入 100 ml 1X TAE buffer 以及 10  $\mu$ l EtBr 之混合液中浸泡 8 分鐘。
- (5).將膠體置於 UV 燈下拍照，並利用 ImageJ 分析結果。

#### (六)結果統計分析方式

##### 1.不同 pH 值處理下 10 天大水稻幼苗生長狀況和葉綠素含量

使用 GraphPad Prism 8 軟體進行統計分析。實驗結果為平均值 $\pm$ 標準誤差 (SEM)。由於本研究地上部與地下部生長數值有三組以上，所以先利用 Shapiro-wilk normality test 分析是否符合常態分布，確認其數值符合常態分佈之後，因各組間具一個變因，故以單因子變異數分析 (One-way ANOVA) 進行分析，並使用 Tukey multiple comparison test 進行比較檢定。各組別間比較若達到統計顯著差異為  $p$  value 小於 0.05 (以\*表示)、0.01 (以\*\*表示)、0.001 (以\*\*\*表示)及 0.0001 (以\*\*\*\*表示)。

##### 2.不同 pH 值處理下 10 天大水稻幼苗 mRNA 表現量

先確認跑膠結果的長度 (bp)是否正確，若沒有錯誤，用 ImageJ 分析膠的照片，框選要比較的 band，並積分算出面積，把亮度數值化，最後除以各組 *OsActin1* 的數值，即可得到各個組別間的比值。

## 肆、研究結果

### 一、不同 pH 值處理下 10 天大水稻幼苗生長狀況

圖 4 為兩品系水稻種子生長 10 天後的部分樣本照片：

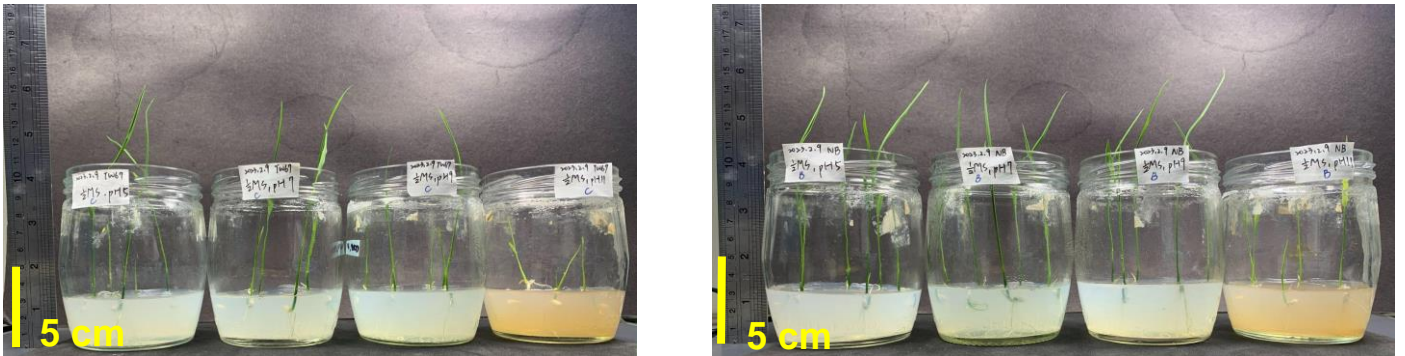


圖 4、TNG67 與 NB 水稻種子於培養基播種 10 天後部分樣本狀況。左圖為 TNG67 種子，右圖則為 NB 種子分別於培養基播種 10 天後，打開醬瓜瓶上蓋後所拍攝之照片所拍攝之照片，黃色直線代表 5 cm 之比例尺。

## (一) 發芽率與地上部生長狀況與葉綠素含量比較

### 1. 水稻種子的發芽率

實驗結果顯示 TNG67 在不同 pH 值處理之下，種子發芽率有不同的結果，介於 76%~100% 之間，其中以 pH 9 的發芽狀況最好、pH 11 發芽狀況最差。NB 種子發芽率在不同 pH 值處理之間差距不大，皆可達 90% 以上。兩品系相較之下，NB 種子的發芽率較為穩定，受 pH 值影響較小 (圖 5)。

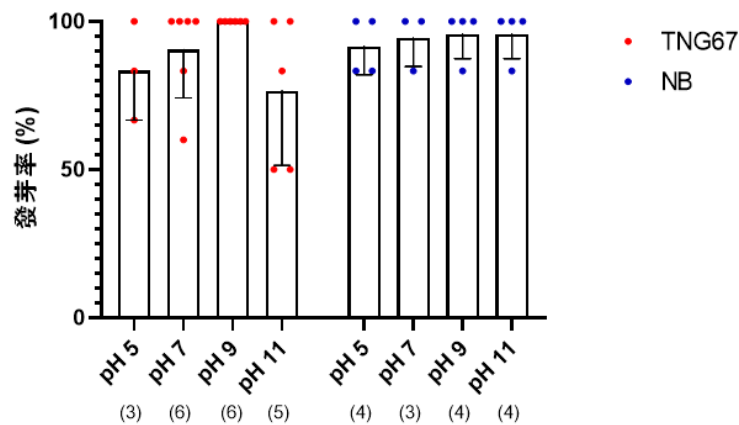


圖 5、兩品系水稻種子在不同 pH 值培養基的發芽率。TNG67 及 NB 兩品系水稻種子發芽率，圖中每一個點都代表一組樣本數為 6 的實驗組，每一個橫軸 pH 值下方的數值代表該數據有幾組實驗組。紅點代表 TNG67 之實驗數據，藍點代表 NB 之實驗數據。此圖使用 GraphPad Prism 8 軟體進行統計分析。實驗結果為平均值±標準誤差 (SEM)。因為發芽率數據有三組資料以上，所以先利用 Shapiro-wilk normality test 分析是否符合常態分布，確認其數值符合常態分佈之後，因各組間具一個變因，故以單因子變異數分析 (One-way ANOVA) 進行分析，並使用 Tukey multiple comparison test 進行事後比較檢定。

## 2. 10 天大水稻幼苗地上部的長度與葉綠素含量

TNG67 水稻幼苗在不同 pH 值處理之下，實驗結果顯示地上部長度最長與長度最短的處理組別 pH 7 與 pH 11 之間有顯著差異。NB 在 pH 7 處理時，生長狀況最好，地上部長度平均可達 14.3 公分，與其他不同 pH 值處理組別有顯著差異，其餘組別地上部長度平均皆低於 10 公分。而 TNG67 在不同 pH 值的處理下，葉綠素含量約為 800 mg/g，各組間皆無顯著差異。NB 在不同 pH 值的處理下，葉綠素含量約為 900 mg/g，各組間亦無顯著差異。不論 TNG67 或 NB 在 pH 11 的處理組別中，葉綠素平均含量都比其他處理組別稍低一些，但無統計上的差異 (圖 6)。

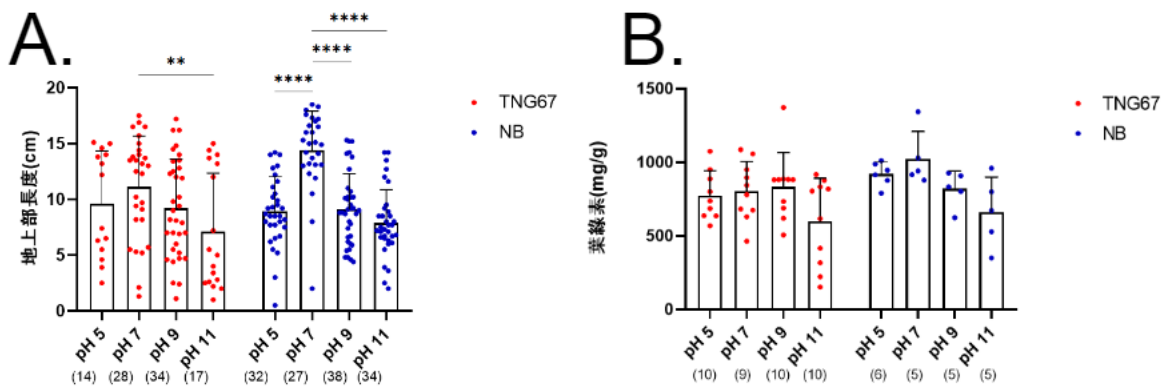


圖 6、TNG67 及 NB 地上部長度(A)及葉綠素含量(B)。在圖 A 中，每一個點都代表每一顆種子發芽後生長 10 天後的地上部長度；而在圖 B 中，每一個點都代表一個培養基上所生長 10 天大水稻幼苗地上部所萃取的葉綠素，且每一個橫軸 pH 值下方的數值代表該數據的實驗組數。紅點代表 TNG67 之實驗數據，藍點代表 NB 之實驗數據。使用 GraphPad Prism 8 軟體進行統計分析。實驗結果為平均值±標準誤差 (SEM)。因為地上部長度與葉綠素含量的數據有三組資料以上，所以先利用 Shapiro-wilk normality test 分析是否符合常態分布，確認其數值符合常態分佈之後且各組間具一個變因，故以單因子變異數分析 (One-way ANOVA) 進行分析，並使用 Tukey multiple comparison test 進行事後比較檢定。各組別間比較若達到統計顯著差異為 p value 小於 0.05 (以\*表示)、0.01 (以\*\*表示)、0.001 (以\*\*\*表示) 及 0.0001 (以\*\*\*\*表示)。



## (二) 地下部生長狀況比較

TNG67 在 pH 11 處理時的實驗結果顯示生長狀況最差，最長根長平均不到 5 公分，與其他組別有顯著差異，其餘組別約為 6 至 7 公分。NB 在 pH 11 處理時，生長狀況最差，最長根長平均約為 7.3 公分，分別與 pH 7 和 pH 9 具有顯著差異。而在 pH 9 處理時，生長狀況最好，與最低組 pH 11 和次低組 pH 5 有顯著差異。在不同 pH 值的處理下，TNG67 的總根長則皆無顯著差異。NB 在 pH 11 處理時，生長狀況較差，且與 pH 7 和 pH 9 之間皆分別具有  $p$  value 小於 0.05 和  $p$  value 小於 0.01 的顯著差異，在 pH 5 處理下，總根長平均約為 23.6 公分，而 pH 11 處理下，平均則為 11.7 公分，而在 pH 7、pH 9 處理下，生長狀況較好。總根數的實驗結果顯示不論 TNG67 或 NB 在不同 pH 值的處理下，各組總根數皆不具有顯著差異 (圖 7)。

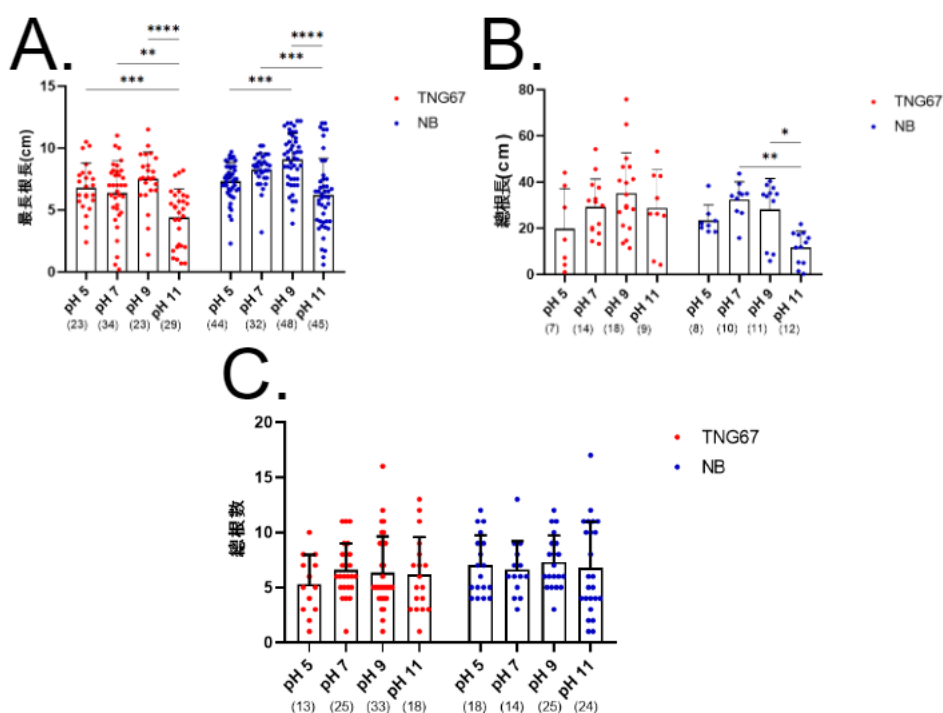


圖 7、TNG67 及 NB 最長根長 (A)、總根長 (B) 及總根數 (C)。在圖 A、B、C 中，每一個點都代表一個樣本點的實驗組，而每一個橫軸 pH 值下方的數值代表該數據的樣本數。使用 GraphPad Prism 8 軟體進行統計分析。紅點代表 TNG67 之實驗數據，藍點代表 NB 之實驗數據。實驗結果為平均值±標準誤差 (SEM)。因為最長根長、總根長、總根數的數據有三組資料以上，所以先利用 Shapiro-wilk normality test 分析是否符合常態分布，確認其數值符合常態分佈之後且各組間具一個變因，故以單因子變異數分析 (One-way ANOVA) 進行分析，並使用 Tukey multiple comparison test 進行事後比較檢定。各組別間比較若達到統計顯著差異為  $p$  value 小於 0.05 (以\*表示)、0.01 (以\*\*表示)、0.001 (以\*\*\*表示) 及 0.0001 (以\*\*\*\*表示)。

### 三、不同 pH 值處理下 10 天大水稻幼苗 mRNA 表現量

萃取不同 pH 值處理下 10 天大水稻幼苗的地上部的 RNA，經 RT-PCR 放大特定基因後，以 ImageJ 分析各組下方 *OsActin1* 和 *OsGRFs* 數值，相除後得到之校正數值標記在下方，以作為不同 pH 值處理間，*OsGRFs* 基因表現量的相對比較值。

#### (一)*OsGRF1*

以 RT-PCR 分析 *OsGRF1* 基因表現的實驗結果顯示 TNG67 在 pH 7 時表現量最多，而 NB 在 pH 5 到 pH 9 的表現量有略微上升的趨勢，但 pH 11 與 pH 9 表現量相同 (圖 8)。

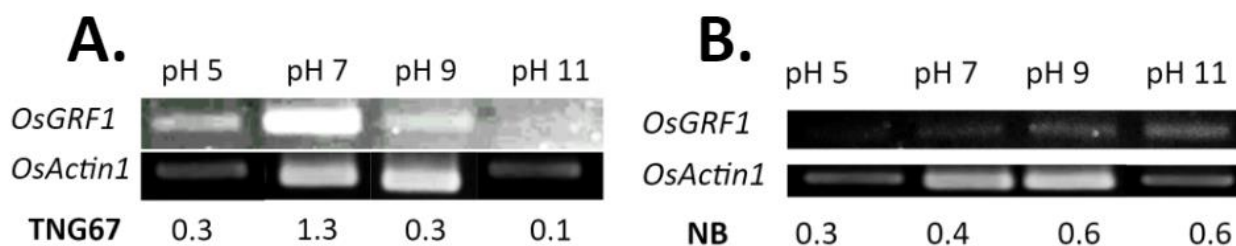


圖 8、TNG67 及 NB 的 *OsGRF1* 之 mRNA 表現量。以 RT-PCR 分別偵測為標準量的 housekeeping gene *OsActin1* 和 *OsGRF1* 基因，跑膠後以 Image J 將所放大的 DNA 影像數值化，兩者相除所得數值為做校正後得到的 *OsGRF1* 基因表現相對結果。

#### (二)*OsGRF3*

以 RT-PCR 分析 *OsGRF3* 基因表現的實驗結果顯示 TNG67 在 pH 11 時表現量最少，但其餘表現量相同，而 NB 在 pH 5 到 pH 11 的表現量相近 (圖 9)。

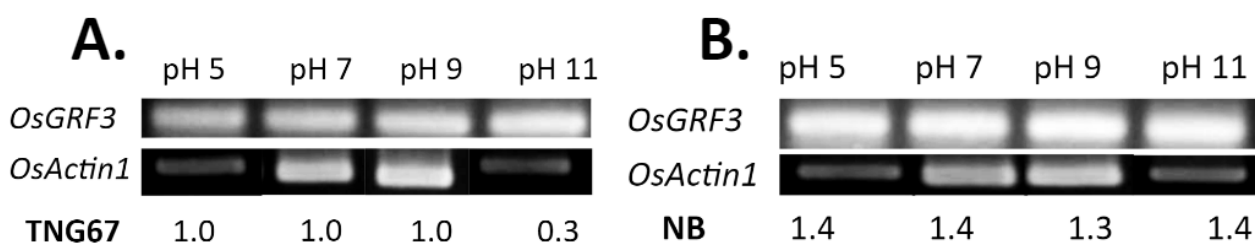


圖 9、TNG67 及 NB 的 *OsGRF3* 之 mRNA 表現量。以 RT-PCR 分別偵測為標準量的 housekeeping gene *OsActin1* 和 *OsGRF3* 基因，跑膠後以 Image J 將所放大的 DNA 影像數值化，兩者相除所得數值為做校正後得到的 *OsGRF3* 基因表現相對結果。

### (三) *OsGRF7*

以 RT-PCR 分析 *OsGRF7* 基因表現的實驗結果顯示 TNG67 在 pH 7 時表現量最大，在 pH 5 和 pH 11 時表現量較低，而 NB 在 pH 7 時表現量最大，在 pH 5 和 pH 11 時表現量較低 (圖 10)。

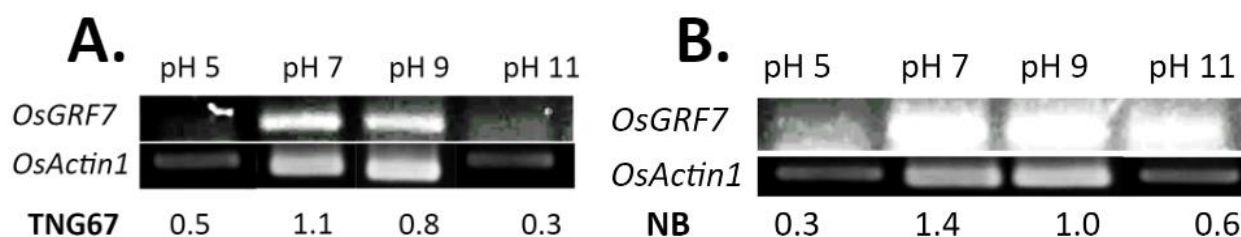


圖 10、TNG67 及 NB 的 *OsGRF7* 之 mRNA 表現量。以 RT-PCR 分別偵測為標準量的 housekeeping gene *OsActin1* 和 *OsGRF7* 基因，跑膠後以 Image J 將所放大的 DNA 影像數值化，兩者相除所得數值為做校正後得到的 *OsGRF7* 基因表現相對結果。

## 伍、討論

### 一、地上部生長數值和葉綠素含量的探討

不同 pH 值處理水稻幼苗的葉綠素含量分析結果顯示，TNG67 和 NB 地上部長度皆是在 pH 7 處理下最高、pH 11 最低。而兩品系地上部長度皆是在 pH 7 時最高，但 TNG67 葉綠素含量以 pH 9 最高；NB 葉綠素含量則以 pH 7 最高，顯示葉綠素含量多寡不完全一致。不過，各組間葉綠素含量在統計上均無顯著差異。

不少研究發現不同 pH 值的處理對植物體內的激素有所影響，例如：蘋果在鹼性逆境下，IAA 相關基因 *ARF5*、*GH3.6*、*SAUR36*、*SAUR32* 的表現量增加，且根部相關 CK 基因 *IPT5* 被顯著誘導，IAA 和 CK 的含量大大增加 (Fang et al., 2021)。由於激素與植物生長有密切關係，我們研究中不同 pH 值地上部長生長狀況的差異是否可能由激素造成，還待進一步研究。

## 二、地下部生長數值的探討

地下部生長數值我們觀察了最長根長、總根長及總根數等項目。在最長根長實驗結果方面，TNG67 及 NB 在 pH 11 處理下最長根長皆為最短，與其他組別相較之下大多有顯著差異。這暗示直接接觸土壤 pH 值的水稻根部，在 pH 11 的鹼性環境下，相對耐鹽的 TNG67 和對鹽敏感的 NB 一樣，根部生長仍然會受影響，和其他中性或為鹼性培養基環境相比，根生長受到影響，最長根長都是最短。

總根長的實驗結果顯示 TNG67 在 pH 5 時平均總根長最短，但統計上未達顯著差異。但 NB 的生長狀況與 TNG67 不相同，在 pH 11 時總根長最短，與 pH 7 和 pH 9 具顯著差異。就總根數而言，實驗結果顯示 TNG67 的總根數在 pH 5 時最少，但統計上未達顯著差異。但 NB 的生長狀況與 TNG67 不相同，在 pH 7 時總根數最少，亦未達統計上顯著差異。由統計結果來看，pH 值對總根數的影響不如最長根長或總根長明顯。

pH 11 的強鹼環境對水稻根長度的生長明顯有不利的影響。但值得注意的是，pH 9 的鹼性環境下，NB 的總根長與最長根長均最高，且與部分組別達到顯著差異；TNG67 則是 pH 9 的最長根長最高，但未達顯著差異的程度。這顯示了 pH 9 雖然是鹼性環境，但未對根生長明顯不利。

先前的研究提到鹼性處理下會藉由降低分生組織區的細胞分裂潛能來抑制阿拉伯芥幼苗的初生根伸長，且乙烯參與了整個過程，還發現鹼性處理導致根生長抑制的原因為乙烯通過刺激 AUX1 和生長素生物合成相關基因的表達來增加生長素累積 (Li et al., 2015)。因此我們的結果在高鹼度下根變短的原因，或許是乙烯的刺激導致根尖生長素變多，進而抑制根的生長。

### 三、mRNA 表現量的探討

*OsGRF1* 為一種水稻轉錄因子蛋白，轉錄因子蛋白充當刺激信號和相關基因之間的橋樑，在面對逆境時，其表現會有明顯的變化 (Fang et al., 2021)。有學者將水稻幼苗，以吉貝素、鹽、乾旱、紫外線、病原體和 ABA 處理，發現 *OsGRF1* 表現量隨吉貝素處理時間影響而上升，而在 ABA 與其他逆境處理後則會下降 (Lu et al., 2020)。在我們的實驗結果中，TNG67 水稻品系的 *OsGRF1* 表現量在 pH 9 和 pH 11 處理組和 pH 5 處理組發生明顯的下降，在 NB 水稻品系的 *OsGRF1* 研究結果中，表現量差異則沒有 TNG67 明顯，我們研究中 TNG67 的結果似乎暗示了 pH 值過高或過低均構成類似逆境的刺激，使 *OsGRF1* 表現量降低。另外實驗結果顯示 TNG67 在 pH 7 時地上部長度最長，似乎暗示 TNG67 水稻之 *OsGRF1* mRNA 表現量高可能是導致其生長較高的主因；然而 NB 品系的結果卻沒有同樣的趨勢。背後的原因是否與兩品系對環境的反應能力不同有關，尚待進一步釐清。

目前已知以 RNA 干擾技術影響 *OsGRF3* 基因表現時，會造成水稻生長延遲及矮化 (Kuijt et al., 2014)；此外，對於逆境下此基因的表現並無太多資料可說明。在我們的研究中，兩品系的水稻在 *OsGRF3* 的表現量上幾乎沒有差異，推測 pH 值並不會影響 *OsGRF3* 的表現量，至於為什麼 TNG67 在 pH 11 與其他組表現量不相同，可能是因為 *OsGRF3* 為正常表現的基因，而非逆境表現基因，所以我們可以推論 TNG67 在 pH 11 時，已使正常表現的基因也停止表現，所以表現量才會與其他組不相同。

先前研究中發現，*OsGRF7* 的過度表現會導致植株生長高度降低，且是通過調控生長素和吉貝素塑造植物結構的關鍵調節因子 (Chen et al., 2020)。在我們的結果中，兩品系的水稻卻與先前研究不符，TNG67 及 NB 皆是 pH 7 時 *OsGRF7* 的表現量最大，但植株地上部長度最高。我們推測兩種水稻在植株最高時 *OsGRF7* 表現量最高可能是因為其未到過度表現的程度，因此未起到抑制的效果。

但前人的研究指出 *OsGRFs* 的基因表現量比較，不一定會與植物生長數值直接相關，因為其產物是否能成功啟動基因轉錄，仍受其他調節因子影響 (Lu et al., 2022)。因此在我們的實驗結果當中，*OsGRF1* 的 NB 和 *OsGRF7* 的 TNG67 及 NB 之 mRNA 表現量與地上部的生長數值的關係與前人研究結果不相符，可能與此因素有關聯，且基因表現時轉錄和轉譯出的產物也有可能抑制基因繼續表現，未來對於基因表現的時間研究可做更細緻的切割。

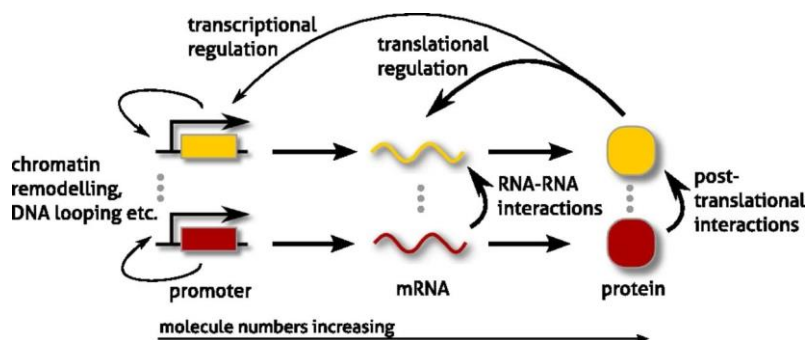


圖 11、mRNA 表現量受轉錄及轉譯影響之示意圖。註：圖片引用自 Thomas, 2014

#### 四、TNG67 和 NB 的生長差異

在前面有提到 TNG67 耐鹽性較高，而 NB 為對高鹽度敏感，我們的實驗結果中，pH 值對兩種品系的影響也是如此，這可在地上部長度、最長根長及總根長得到應證。在地上部長度中，TNG67 的最低組 pH 11 與最高組 pH 7 只具  $p$  value 小於 0.01 的顯著差異，而 NB 的最低組 pH 11 與最高組 pH 7 則具有  $p$  value 小於 0.0001 的顯著差異。在最長根長中，兩者在 pH 11 處理下均為最短，但 TNG67 與其他組具一個  $p$  value 小於 0.01、一個  $p$  value 小於 0.001 及一個  $p$  value 小於 0.0001 的顯著差異，而 NB 則為兩個  $p$  value 小於 0.001 及一個  $p$  value 小於 0.0001 的顯著差異。在總根長中，TNG67 各組之間皆沒有顯著差異，而 NB 則為一個  $p$  value 小於 0.01 及一個  $p$  value 小於 0.05 的顯著差異。可見 NB 品系在 pH 11 時，不僅生長不佳，且與其他組有較明顯落差；我們據此推論，NB 品系水稻耐鹼程度可能不如 TNG67。

## 五、農業上的應用

土壤酸鹼值對農業有深遠的影響。例如在土壤中加入石灰中和酸化土壤、進行土壤改良，便是農業上經常使用的策略。一項回顧性的大型研究顯示 (Holland et al., 2019)，長期施用石灰的土壤，pH 值最終可到達 7~8 之間。而在一定範圍內農作產量和 pH 值有正相關性，pH 7~8 的弱鹼環境下農作產量和弱酸性時相當或是甚至更佳。本實驗中 pH 9 時 NB 的總根長及最長根長和 TNG67 的最長根長長得最好，似乎和前項結果可相呼應，這說明雖然過鹼 (如 pH 11) 對植物生長不利，但弱鹼性環境對於水稻不見得有不利影響。然而另外一點要注意的是：石灰能改善土壤、有利作物生長，也有可能是因為鈣離子的影響。未來可以在培養基中加入 EDTA 或 EGTA 來抑制鈣離子，探討鈣離子是否與植物生長狀況有關。

## 陸、結論

一、以地上部而言，TNG67 及 NB 的地上部長度皆在 pH 11 時最短，且兩者皆與其他 pH 值具有顯著差異。TNG67 和 NB 的葉綠素含量皆為在 pH 11 時較少，但兩者皆未與其他 pH 值達到顯著差異。兩品系地上部生長狀況受 pH 值影響後的生長狀況較不一致。

二、以地下部而言，TNG67 和 NB 的最長根長皆在 pH 11 時最短，且兩者大多與其他 pH 值具有顯著差異。然而 TNG67 的總根長在 pH 5 時最短，與其他 pH 值未達顯著差異；而 NB 則是在 pH 11 時最短，與 pH 7 和 pH 9 具顯著差異。另外，TNG67 的總根數在 pH 5 時最少，而 NB 則是在 pH 7 時最少，但與其他 pH 值均未達顯著差異。整體而言，pH 11 對兩品系的地下部生長都有較不好的影響。

三、比較實驗結果後發現，*OsGRF1*、*OsGRF3* 和 *OsGRF7* 基因似乎和地上部長度及葉綠素含量之間沒有關聯，*OsGRF1* 的表現量在兩品系間沒有相似的趨勢，*OsGRF3* 則能發現在兩水稻品系的表現量似乎都不受 pH 值影響，*OsGRF7* 的表現量在兩品系中均在 pH 7 的情況下有最大值。

## 柒、參考資料

- 吳美瑩。(2017)。麥寮與台西土壤肥力及品質探討。朝陽科技大學碩士論文。
- 林佳瑩。(2014)。利用農桿菌滲入法與農桿菌注射法建立監測植體含磷狀態之系統。台灣大學生物資源暨農學院園藝暨景觀學系碩士論文。
- 張瑀芳、蔡呈奇。(2009)。宜蘭南澳地區海岸防風林土壤性質的空間變化。宜蘭大學生物資源學刊，5(1)：29-39。
- 陳吉村。(2015)。東部水田土壤肥力管理。行政院農業委員會花蓮區農業改良場。
- 黃真生、陳源泉、洪信雄、陳正昌。(2014)。百年農業發展史-台農 67 號。農業知識入口網。[https://kmweb.coa.gov.tw/theme\\_data.php?theme=important\\_breed&id=31](https://kmweb.coa.gov.tw/theme_data.php?theme=important_breed&id=31)
- 楊藝璋。(2015)。具逆境耐性差異之水稻幼苗(台農 67 號與台中在來 1 號)其地上部與地下部於低溫、鹽逆境及回復處理下之比較轉錄體學分析。台灣大學農藝系博士論文
- 謝元德、卓家榮、林晉卿、林經偉。(1998)。農田地力增進-農作物現代化生產技術(No. 84; Issues 87 - 12)。台南區農業改良場。
- Chen, Y., Dan, Z., Gao, F., Chen, P., Fan, F., & Li, S. (2020). Rice GROWTH-REGULATING FACTOR7 modulates plant architecture through regulating GA and indole-3-acetic acid metabolism. *Plant physiology*, 184(1), 393-406.
- Choi, D., Kim, J. H., & Kende, H. (2004). Whole genome analysis of the *OsGRF* gene family encoding plant-specific putative transcription activators in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant and Cell Physiology*, 45(7), 897-904.
- Fang, S., Hou, X., & Liang, X. (2021). Response mechanisms of plants under saline-alkali stress. *Frontiers in Plant Science*, 12, 667458.
- Ferdose, J., Kawasaki, M., Taniguchi, M., & Miyake, H. (2009). Differential sensitivity of rice cultivars to salinity and its relation to ion accumulation and root tip structure. *Plant Production Science*, 12(4), 453-461.
- Holland, J. E., White, P. J., Glendining, M. J., Goulding, K. W. T., & McGrath, S. P. (2019). Yield responses of arable crops to liming – An evaluation of relationships between yields and soil pH from a long-term liming experiment. *European Journal of Agronomy*, 105, 176-188.
- Hour, A. L., Lin, Y. C., Li, P. F., Chow, T. Y., Lu, W. F., Wei, F. J., & Hsing, Y. I. C. (2007). Detection of SNPs between Tainung 67 and Nipponbare rice cultivars. *Botanical Studies*, 48(3), 243-253.



- Kuijt, S. J., Greco, R., Agalou, A., Shao, J., 't Hoen, C. C., Övernäs, E., ... & Ouwerkerk, P. B. (2014). Interaction between the GROWTH-REGULATING FACTOR and KNOTTED1-LIKE HOMEODOMAIN families of transcription factors. *Plant physiology*, *164*(4), 1952-1966.
- Li, J., Xu, H. H., Liu, W. C., Zhang, X. W., & Lu, Y. T. (2015). Ethylene inhibits root elongation during alkaline stress through *AUXIN1* and associated changes in auxin accumulation. *Plant physiology*, *168*(4), 1777-1791.
- Lu, Y., Meng, Y., Zeng, J., Luo, Y., Feng, Z., Bian, L., & Gao, S. (2020). Coordination between GROWTH-REGULATING FACTOR1 and GRF-INTERACTING FACTOR1 plays a key role in regulating leaf growth in rice. *BMC plant biology*, *20*(1), 1-12.
- Lu, Y., Zeng, J., & Liu, Q. (2022). The Rice miR396-GRF-GIF-SWI/SNF Module: A Player in GA Signaling. *Frontiers in Plant Science*, *12*, 3226.
- Matsumoto, T., Wu, J., Itoh, T., Numa, H., Antonio, B., & Sasaki, T. (2016). The Nipponbare genome and the next-generation of rice genomics research in Japan. *Rice*, *9*, 1-11.
- Thomas, P., Popović, N., & Grima, R. (2014). Phenotypic switching in gene regulatory networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(19), 6994-6999.

## 【評語】 052104

1. 本研究探討鹼化對水稻的影響，觀察兩種水稻品系在不同 pH 值培養基下，地上、地下部生長數值，及轉錄因子 OsGRF1、3、7 基因表現差異。
2. 本研究選擇 OsGRF1、OsGRF3、OsGRF7 三個基因作為主要觀察 pH 值變化下水稻幼苗的基因表現，是否適合及具代表性需加以考量。
3. 本研究完整度不錯。前言部分深入了解台灣土壤個縣市酸鹼度的差異，而討論部分也能與相關的研究成果作周詳比較與論述。惟基因表現定量的精準度上可再強化。

# 作品海報

# 《鹼稻「巧一丸」?》

探討水稻在鹼性環境下的生長差異與基因表現

# 摘要

全球暖化引發的海平面上升會導致土壤鹽鹼化而影響作物的生長，本研究探討鹼化對水稻的影響，觀察兩種水稻品系在不同 pH 值培養基下，地上部與地下部的生長數值，以及生長調節基因*OsGRF1*、*3*、*7* 的表現差異。結果顯示水稻幼苗在 pH 11 處理下生長較差，不論是耐鹽的TNG67或鹽敏感的NB水稻在高鹼環境中生長皆被抑制。此外，結果顯示在 pH 5、7、9、11中兩品系水稻葉綠素含量皆沒有統計上的顯著差異。在基因表現上，TNG67水稻之*OsGRF1* mRNA表現量高可能是導致其植株生長較高的主因，*OsGRF3*的表現幾乎不受影響，*OsGRF7*的表現量在兩品系中均在 pH 7 有最大值，以上結果暗示*OsGRF1*的基因表現量在 pH 5~pH 9 與TNG67地上部生長呈正相關。

# 前言

## 研究動機

土壤鹽鹼化是植物遭遇的逆境之一，我們好奇若除去鈉離子的影響，在鹽鹼化中「鹼」對臺灣的主要糧食作物—水稻會造成什麼影響，於是我們選定水稻幼苗之地上部、地下部、葉綠素含量作為觀察的對象。另外，環境的高 pH 值常會引發細胞內的改變，進而使相關基因的表現也發生變化。我們也好奇鹼性處理會影響哪些水稻生長與發育的基因，在上網查詢相關論文後發現許多水稻幼苗研究的論文常提到*OsGRFs*家族，而*OsGRFs*是一種水稻的生長調節基因，會優先在年輕和生長的組織中表現。*OsGRF1*在吉貝素誘導的水稻節間伸長過程中表現量會增加。*OsGRF3*以RNA干擾而無法表現時，會導致水稻無法長高。*OsGRF7*可以調節水稻中的生長素和吉貝素代謝。故我們選擇這三種基因的表現作為觀察對象。

## 研究目的

- 一、探討水稻在鹼性環境下，10 天大幼苗地上部的生長狀況及葉綠素含量
- 二、探討水稻在鹼性環境下，10 天大幼苗地下部的生長狀況
- 三、探討水稻在鹼性環境下，10 天大幼苗*OsGRFs*基因的mRNA表現量

# 研究過程及方法

配置 pH 5 (酸性對照組)、7 (中性對照組)、9、11(鹼性實驗組) 的培養基

將TNG67、NB水稻種子種入培養基中並置於植物生長箱內培養 10 天後取得樣本

測量地上部和地下部的各項生長數值

測量地上部葉綠素含量

分析地上部在*OsGRF1*、*OsGRF3*、*OsGRF7*的表現量

利用GraphPad Prism 8 分析並繪製成圖表  
以One-way ANOVA分析，並使用Tukey multiple comparison test 比較檢定

磨碎地上部並萃取mRNA

加入RT Primer Mix 和RT Enzyme Mix 製成cDNA

利用PCR 增大*OsGRFs* 與*OsActin1* 的cDNA

跑膠並用ImageJ量化PCR產物

藉由圖表探討不同 pH 值對植株生長之影響

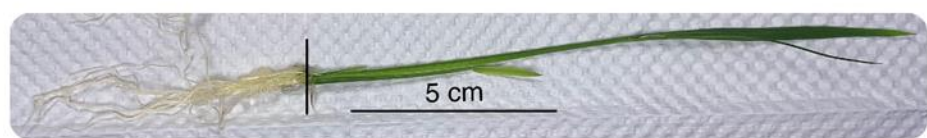
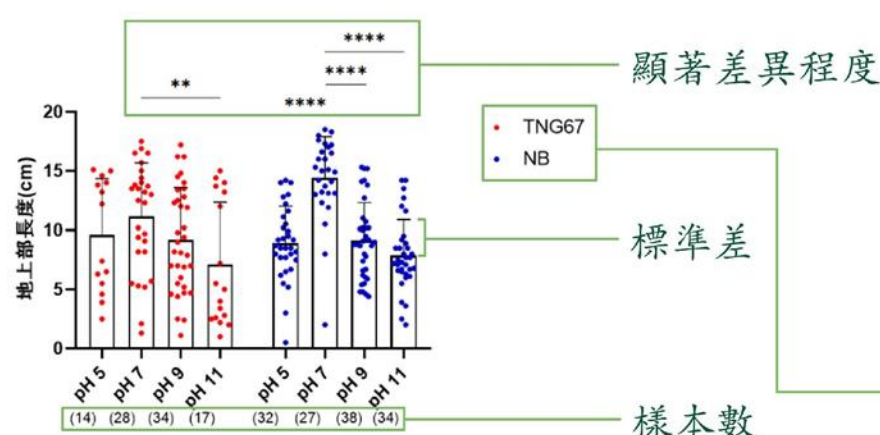


圖1、10 天大水稻幼苗，直線代表地上部及地下部之分隔線，橫線代表 5 cm 之比例尺。

# 研究結果

## 結果圖表圖標說明



p value	表示方法	p value	表示方法
< 0.05	*	< 0.001	***
< 0.01	**	< 0.0001	****

品系	特色
TNG67	對鹽逆境容忍度較高
NB	對鹽逆境較敏感

## 發芽率

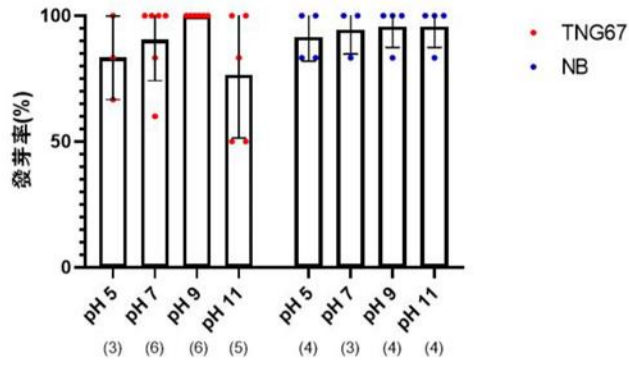


圖2、TNG67及NB發芽率

每一個橫軸 pH 值下方的數值代表該數據的實驗重複組數而一組實驗組代表1個培養基中的發芽率

## 地上部長度

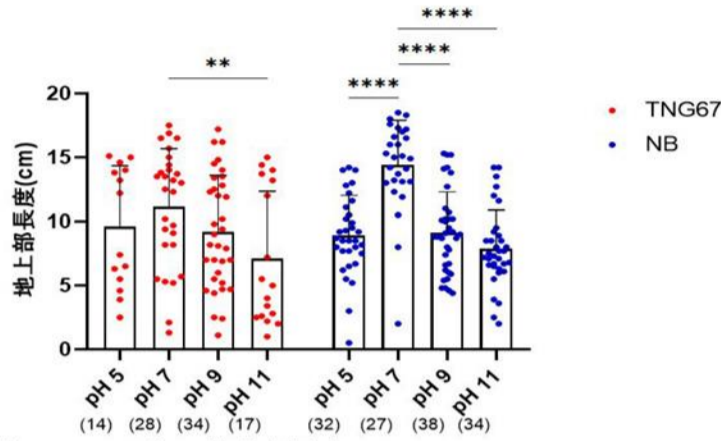


圖3、TNG67及NB地上部長度

每一個橫軸 pH 值下方的數值代表該數據的樣本數

## 葉綠素含量

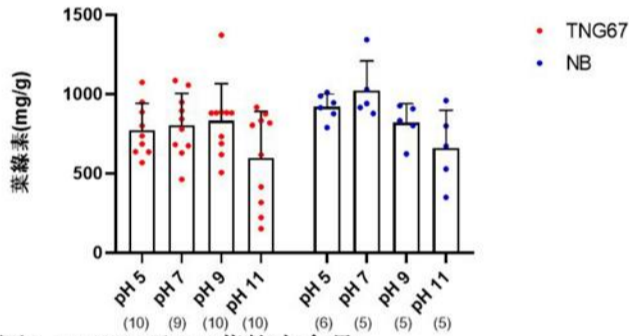


圖4、TNG67及NB葉綠素含量

每一個橫軸 pH 值下方的數值代表該數據的實驗重複組數而一組實驗組代表1個培養基中幼苗地上部所萃取的葉綠素

## 最長根長

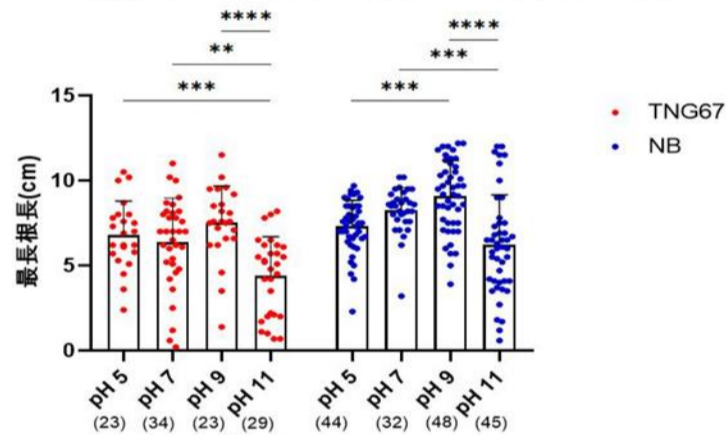


圖5、TNG67及NB最長根長

每一個橫軸 pH 值下方的數值代表該數據的樣本數

## 總根長

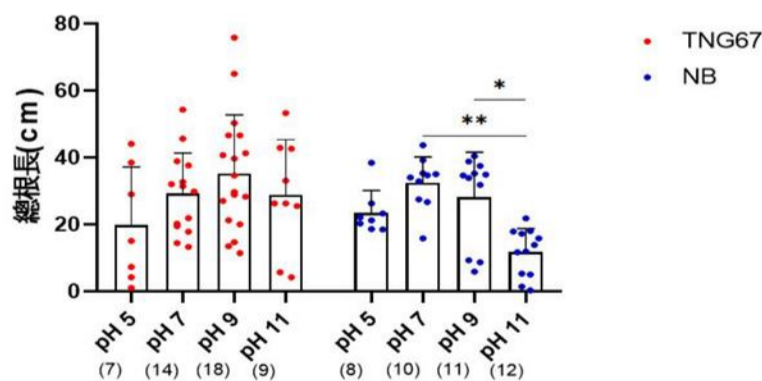


圖6、TNG67及NB總根長

每一個橫軸 pH 值下方的數值代表該數據的樣本數

## 總根數

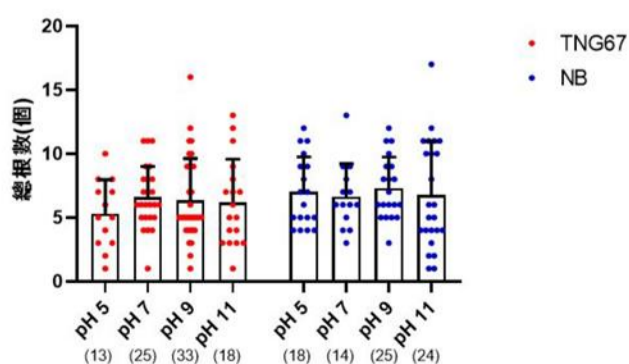


圖7、TNG67及NB總根數

每一個橫軸 pH 值下方的數值代表該數據的樣本數

## 兩品系在各pH值之間皆無顯著差異

實驗結果顯示TNG67在不同 pH 值處理之下，種子發芽率有不同的結果，介於 76%~100%之間，其中以 pH 9 的發芽狀況最好、pH 11 發芽狀況最差，但統計上並沒有顯著差異。NB種子發芽率在不同 pH 值處理之間差距不大，皆可達 90%以上。兩品系相較之下，NB種子的發芽率較為穩定，受 pH 值影響較小 (圖2)。

## 兩品系在 pH 11 皆生長不佳

TNG67水稻幼苗在不同 pH 值處理之下，實驗結果顯示地上部長度最長與長度最短的處理組別 pH 7 與 pH 11 之間有顯著差異。NB在 pH 7 處理時，生長狀況最好，地上部長度平均可達 14.3 cm，與其他不同 pH 值處理組別有顯著差異，其餘組別地上部長度平均皆低於 10 cm (圖3)。

## 兩品系在各pH值之間皆無顯著差異

TNG67在不同 pH 值的處理下，葉綠素含量約為 800 mg/g，各組間皆無顯著差異。NB在不同 pH 值的處理下，葉綠素含量約為 900 mg/g，各組間亦無顯著差異。不論TNG67或NB在 pH 11 的處理組別中，葉綠素平均含量都比其他處理組別稍低一些，但皆未達統計上的顯著差異 (圖4)。

## 兩品系在 pH 11 皆生長不佳

TNG67在 pH 11 處理時的實驗結果顯示生長狀況最差，最長根長平均不到 5 cm，與其他組別有顯著差異，其餘組別約為 6 至 7 cm。NB在 pH 11 處理時，生長狀況最差，最長根長平均約為 7.3 cm，分別與 pH 7 和 pH 9 具顯著差異。而在 pH 9 處理時，生長狀況最好，與最低組 pH 11 和次低組 pH 5 有顯著差異 (圖5)。

## NB在 pH 11 生長不佳

在不同 pH 值的處理下，TNG67的總根長則皆無顯著差異。NB在 pH 11 處理時，生長狀況較差，且與 pH 7 和 pH 9 之間皆具有顯著差異，在 pH 5 處理下，總根長平均約為 23.6 cm，而 pH 11 處理下，平均則為 11.7 cm，而在 pH 7、pH 9 處理下，生長狀況較好 (圖6)。

## 兩品系在各pH值之間皆無顯著差異

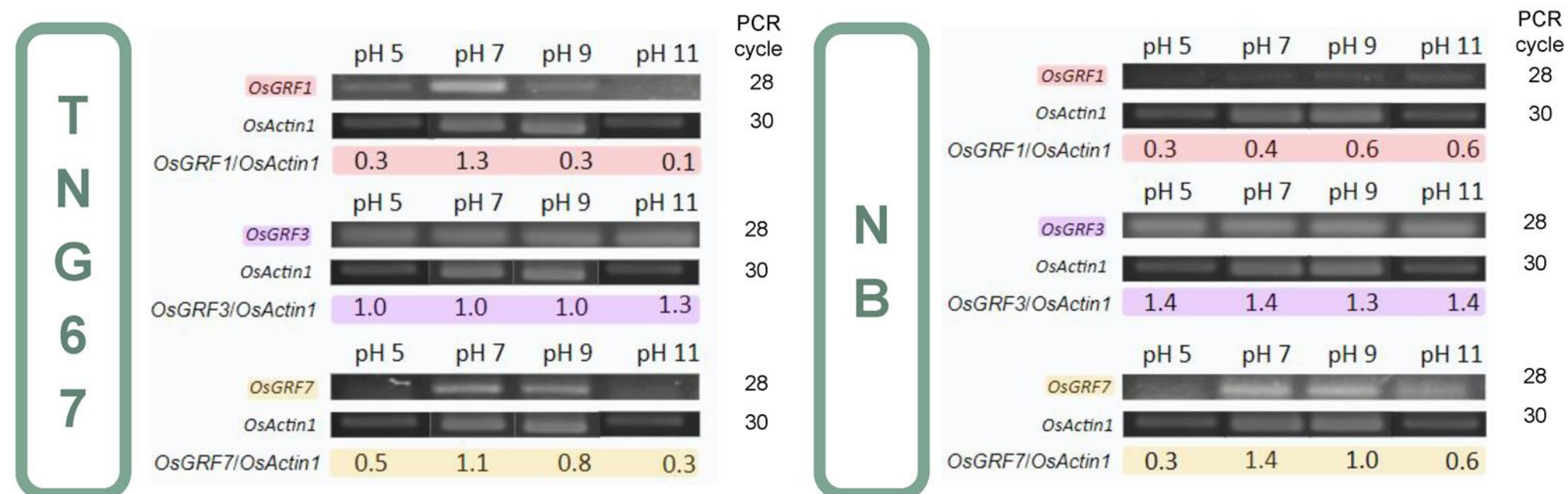
總根數的實驗結果顯示不論TNG67或NB在不同 pH 值的處理下，各組總根數皆不具有顯著差異 (圖7)。

## 水稻幼苗地上部

## 水稻幼苗地下部

# 研究結果

下圖為OsGRFs的跑膠圖片，以ImageJ分析各組下方OsActin1和OsGRFs數值，相除後得到之數值標記在下方，數值可以表示基因相對表現量。



## 討論

### 一、mRNA表現量的探討

OsGRF種類	文獻報導	TNG67實驗結果		NB實驗結果	
		基因表現量	地上部長度	基因表現量	地上部長度
OsGRF1	離層素與其他逆境處理後表現量下降	pH 11 最小	pH 11 最矮	各組相似	各組不同
OsGRF3	以RNA干擾會造成水稻生長延遲及矮化	各組相似	各組不同	各組相似	各組不同
OsGRF7	過度表現會導致植株生長高度降低	pH 7 最大	pH 7 最高	pH 7 最大	pH 7 最高

以上結果暗示OsGRF1在 pH 5~pH 9 與TNG67地上部生長呈正相關。

### 二、TNG67和NB的生長差異

顯著差異程度為 pH 7 和 pH 11 比較之結果。

品系	生長數值	地上部長度	最長根長	總根長
TNG67		**	**	無顯著差異
NB		****	***	**

#### NB耐鹼程度不如TNG67

在前面有提到TNG67耐鹽性較高，而NB為對高鹽度敏感，我們的結果中，NB代表顯著差異的星數在很多生長數值當中都多於TNG67，可見NB在 pH 11時，不僅生長不佳，且與其他組別有較明顯落差。

### 三、農業上的應用

#### 在農業施作上

前人研究中表明因過酸而長期施用石灰的土壤，pH 值最終可達 7~8 之間。而在一定範圍內農作產量和 pH 值有正相關性，pH 7~8 的弱鹼環境下農作物產量和弱酸性時相當或是甚至更佳，此與我們研究結果相符。

#### 在生物科技上

可以針對OsGRF1做進一步的應用，研究其他具有商業價值的品系，利用基因編輯技術，進一步增強水稻品系的高 pH 值的耐受度及產量等表現。

## 結論

一、下表的 pH 值為各組生長數值中生長最差的組別，其中發芽率、葉綠素含量及總根數與各組間皆未具顯著差異。

品系	生長數值	地上部長度	最長根長	總根長
TNG67		pH 11 pH 5-無顯著差異 pH 7-**	pH 11 pH 5-*** pH 7-**	無顯著差異
NB		pH 11 pH 5-無顯著差異 pH 7-****	pH 11 pH 5-無顯著差異 pH 7-***	pH 11 pH 5-無顯著差異 pH 7-**

二、比較實驗結果後發現，OsGRF1的表現量在兩品系間沒有相似的趨勢，但結果似乎暗示在 pH 5~pH 9 與TNG67地上部生長呈正相關，OsGRF3則能發現在兩水稻品系的表現量似乎都不受 pH 值影響，OsGRF7的表現量在兩品系中均在 pH 7 時有最大值。