

2023 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 060009
參展科別 植物學
作品名稱 探討 *RePRP* 基因對水稻抗生物逆境的表現
得獎獎項

就讀學校 國立臺灣師範大學附屬高級中學
指導教師 賀瑞華、羅尹廷
作者姓名 羅稚琳

關鍵詞 *RePRP* 基因、茉莉酸、幾丁質酶

作者簡介



我叫羅稚琳，現就讀師大附中 1543 班。當初剛升高中時，憑藉著對生物的一股熱情，考進了中央研究院的生命科學人才培育計畫中，而後一步一步的做起了這份研究。身為普通班的我，只能瘋狂的利用課餘時間至實驗室做實驗，一點一點從實驗的了解到架構、操作。一路走來的我發現，所有以前的努力都將成為未來鋪路的原料，每一步都踏實走過，才不會有所遺憾。

Abstract

Previous studies have found that under the abiotic stress of drought and high salinity, the concentration of ABA in rice will increase, and the expression of *RePRP* gene will be activated, and then reduce water loss. Jasmonic acid, which also activates the expression of the *RePRP* gene, is an important hormone for plants to resist biotic stress. Therefore, lettuce and magnaporthe oryzae were used as the stimulators of plant allelopathy and plant defense in the experiment to test the performance of *RePRP* gene in rice. The results showed that the overexpression of *RePRP* gene can inhibit the growth of lettuce radicle and seedlings. It is speculated that when co-cultivation with other plants, the performance of *RePRP* gene will be induced and rice will have an effect of allelopathy. After magnaporthe oryzae infection, the lengths of young roots and seedlings of the *RePRP* gene-suppressed strains were shorter. And after treatment with different concentrations of MeJA, the root chitinase decomposition ability of the *RePRP* gene overexpression strain was better, and with the increase of the concentration of MeJA, the concentration of chitinase also increased. Therefore, it is speculated that after fungal infection, the performance of *RePRP* gene will be induced, resulting in an increase in the concentration of chitinase, which helps rice resist fungal infection.

摘要

前人研究發現在乾旱與高鹽的非生物逆境下，水稻體內的離層酸濃度上升，進而活化 *RePRP* 基因的表現，以減少水分散失渡過環境逆境。而同樣會活化 *RePRP* 基因表現的茉莉酸，是植物在對抗生物逆境時重要的激素。因此實驗中以萵苣及稻熱病菌為植物排他與植物防禦的刺激者，測試水稻的 *RePRP* 基因表現實驗，結果發現 *RePRP* 基因大量表現株會抑制萵苣的胚根及幼苗生長，推測與他種植物共同栽培時，會誘導 *RePRP* 基因表現，使水稻進行排他作用。另一方面發現當水稻被稻熱病菌感染後，*RePRP* 基因抑制株的幼根與幼苗長度較短，而以不同濃度的 MeJA 處理後，*RePRP* 基因過表現株其根部幾丁質酶的分解能力較佳，且當 MeJA 的濃度越高，幾丁質酶的濃度也隨之增加。因此推測真菌感染後，會誘導 *RePRP* 基因表現，造成幾丁質酶濃度增加，協助水稻抵抗真菌感染。

壹、前言

一、研究動機

對於無法自由移動的植物來說，植物該如何應付可能遭遇到的困境呢？有學者以亞洲區主要的糧食作物—水稻為材料，研究重複性富脯胺酸蛋白質（REPETITIVE PROLINE-RICH PROTEIN, RePRP）對水稻抗逆境的影響，並指出這個基因會被某些植物激素，如離層酸（Abscisic acid, ABA）、茉莉酸（Jasmonic acid, JA）與水楊酸（Salicylic acid, SA）…等誘導產生重複性富脯胺酸蛋白質，而這幾種激素也正是植物於防禦及對抗逆境時會生成的逆境激素。植物遭遇的

逆境包括有非生物性與生物性兩大類，非生物性逆境有缺水、淹水、高鹽、高溫、低溫…等因素；而生物逆境則有植食性昆蟲、病原菌（病毒、細菌與真菌）以及共同競爭環境資源的雜草…等。在 ABA 處理、高鹽以及缺水時，重複性富脯胺酸蛋白質會在水稻根部被誘導，其中這個基因家族包含了 4 個基因(*RePRP1.1*, *1.2*, *2.1*, *2.2*)。這些基因編碼了兩個具有高度重複的富含脯胺酸的糖蛋白超二級結構 (motif)：PX1PX2, *RePRP1* 及 *RePRP2*。而 *RePRP* 的直向同源物僅出現在單子葉植物中，而且目前仍不了解它們的功能。水稻的 *RePRP* 蛋白質在多個羧脯胺酸殘基上會被阿拉伯糖以及葡萄糖高度糖基化，它們不同於由阿拉伯糖與半乳糖組成聚糖鏈的阿拉伯半乳聚糖。且以 *RePRP* 綠螢光蛋白短暫的標定後可發現，它們大部分位於細胞膜上。以 ABA 處理會使 *RePRP* 基因在水稻根部延長部中大量表現，且 *RePRP* 基因大量表現的轉殖株，在沒有 ABA 誘導時，就會使根部較短，如同野生種被 ABA 處理一樣。相反的，*RePRP* 基因抑制表現株會對 ABA 較不敏感，這指出了 *RePRP* 蛋白質在水稻根部的發育以及 ABA 的刺激中，扮演了非常重要的角色。除此之外，水稻的 *RePRP* 蛋白質特別會與多醣阿拉伯半乳聚糖相互作用，表示 *RePRP* 蛋白是根部生長多餘的抑制物，且可能透過在細胞膜附近的細胞壁之物質相互作用(Tseng *et al*, 2013)。

本研究想以真菌感染逆境以及他種職務共同栽培逆境為出發，探討 *RePRP* 基因對水稻於生物性逆境下的表現。首先植物在與他種職務共同栽培時，會分泌數種植物抗毒素進行排他作用 (allelopathy)，而莫米內酯 (momilactone) 便是其中之一，且有研究指出，momilactone A 型與 B 型在水稻相剋作用中扮演了重要

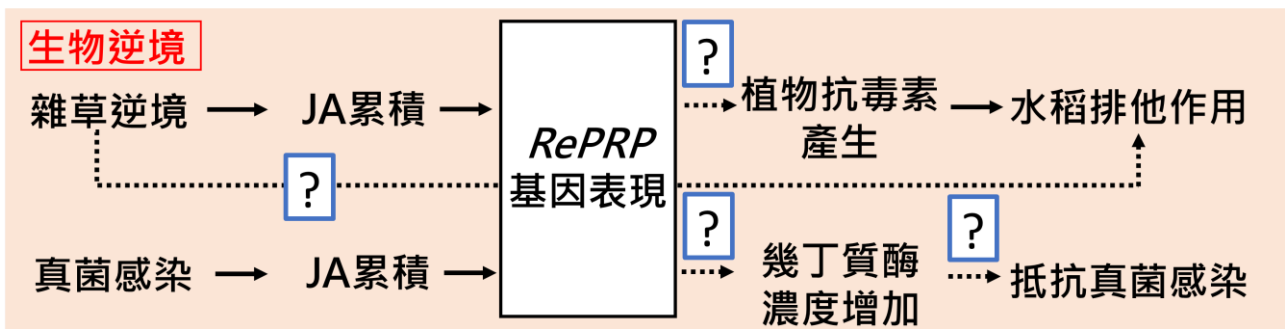
的角色，也指出茉莉酸甲酯（MeJA）會誘導其產生(Bi *et al*, 2007)。在其他的實驗中顯示，將不同種的水稻與萵苣進行共同栽培實驗，對於這類化學分泌物敏感的萵苣，在 7 天大時，當與水稻一同種植時，其根長的生長會明顯被抑制(Noguchi & Peter, 2013)。在先前的研究中發現，*RePRP*基因大量表現的水稻植株，根部會分泌較多的 momilactone (Lin, 未發表)，因此想探討水稻是否在被 JA 誘導後，其根部的 momilactone 含量會隨之增高，且當 *RePRP*基因大量表現株與對 momilactone 敏感的萵苣共同栽培時，萵苣的生長是否會被影響。

再來是抵抗真菌感染逆境部分，既然我們知道 *RePRP* 是一個會影響植物對抗逆境的基因，那它是否也可以對抗真菌？*RePRP* 這個基因會被 JA 誘導，有研究指出 JA 能誘導幾丁質酶的產生 (Rakwal *et al*, 2004)。植物合成幾丁質酶可分解由幾丁質組成的真菌細胞壁，以對抗真菌感染。而稻熱病菌 (*Magnaporthe grisea* (Hebert) M.E. Barr.) 為常見於水稻的真菌感染疾病，因此本實驗透過稻熱病菌感染水稻與否，探討真菌感染與否對 *RePRP* 基因過表現水稻株或抑制表現水稻株生長的影響。另外再以植物激素茉莉酸甲酯 (Methyl jasmonate, MeJA) 的處理下，測量水稻幾丁質酶的表現與表現量多寡，用以探討 *RePRP* 基因與水稻產生幾丁質酶間的關聯。

二、 目的

- (一) 探討 *RePRP* 基因被誘導時是否會促進水稻的排他作用。
- (二) 探討 *RePRP* 基因是否可促使植物抵禦真菌感染。

- (三) 探討不同濃度植物激素 MeJA 處理下，*RePRP* 基因是否增強幾丁質酶分解的能力。
- (四) 探討不同濃度植物激素 MeJA 處理下，*RePRP* 基因過表現植株，其幾丁質酶的量是否較多。



貳、研究過程或方法及進行步驟

一、研究設備與器材

(一) 實驗材料

1. 水稻 (*Oryza sativa*): 以台農 67 號為野生型。台農 67 號為野生型為國內學術研究上，重要的材料，並以農桿菌轉殖技術，將 *RePRP* 基因序列轉入水稻中，篩選後為本實驗的 *RePRP* 基因大量表現轉植株。並將 *RePRP* 基因互補序列相同的方式轉入水稻中，使水稻以 RNAi 機制使 *RePRP* 基因靜默，篩選後為本實驗的 *RePRP* 基因抑制表現組。
2. 粉葉萵苣 (*Lactuca sativa*.)
3. 稻熱病菌 (*Magnaporthe grisea* (Hebert) M.E. Barr.)

(二) 實驗藥品

漂白水(長榮化學工業，高力士優)	TWEEN 20(聚山梨醇酯 20)
茉莉酸甲酯(Methyl jasmonate, MeJA)	Bradford dye(1X)
Tris-Glycine buffer(250mM Tris, 1.92M Glycine, 1% SDS)	Western Transfer buffer(250 mM Tris, 1.92M Glycine)
TBST(1X TBS, 0.1% TWEEN-20)	乳清蛋白液(5%奶粉)
一次抗體(Rabbit anti-CHIT8, Agrisera # AS15 2889)	二次抗體(Anti-rabbit-HEP, PekinElmer)
酵素冷光試劑(Bio-RAD)	考克馬斯亮藍(Coomassie brilliant blue)

(三) 實驗器材

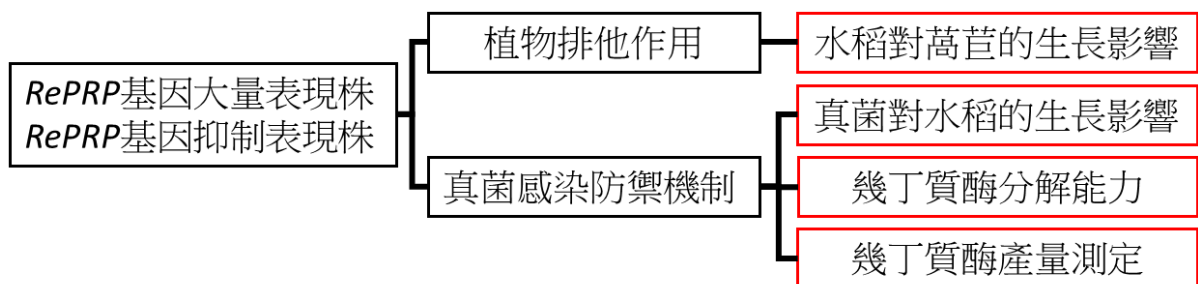
滅菌土（泥炭土：根基旺=1:2）	水耕液(1/2 Kimura solution)
馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基 (Potato dextrose agar, PDA)	數位相機 (Olympus)
96 孔盤	轉印模 (PVDA membrane)

(四) 實驗設備

28°C 植物生長箱	樣品均質機 (KURABO/JAPAN SH-
------------	-------------------------

	100)
分光光度計(BioTek)	乾浴槽(Basic Life, BL3002)
電泳槽(Bio-Rad)	濕式轉漬槽(Bio-RAD)
超高感度冷光數位影像系統 (UVP ChemiDoc-IT 510 Imaging System, 波長 595nm)	

二、 研究流程



三、 研究方法及步驟

(一) 探討 *RePRP* 基因被誘導時是否會促進水稻的排他作用。

1. 水稻種子消毒與培養

取漂白水 5 mL 與 Tween 20 100 μ L 加逆滲透水至 100 mL，配製成水稻種子消毒液。將消毒水與水稻種子混合搖勻。照光放置於實驗桌上 16~18 小時。倒掉消毒水後，加入逆滲透水混合均勻。再倒掉逆滲透水，加入新的逆滲透水，重複此步驟三次。將消毒好的種子放到含濾紙的培養皿裡，每盤加入 10 c.c. 的逆滲透水。用鋁箔紙包覆避免照光。於 28°C 的植物生長箱裡放置

3 天。

2. 萵苣種子消毒與培養

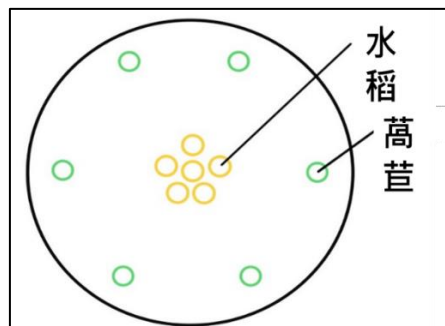
將萵苣種子與 75 %酒精混合搖勻 30 秒，倒掉消毒水，加入逆滲透水混勻。倒掉原本的逆滲透水，加入新的逆滲透水，重複此步驟三次。將消毒好的種子放到含濾紙的培養皿中，每盤加入 10 c.c.的逆滲透水，並以石臘膜封住，於 28 °C 照光的植物生長箱裡培養 3 天。

3. 水稻與萵苣培養皿共培

將 3 粒水稻種子消毒後發芽 3 天。第 3 天將水稻移至水耕液裡種 3 天。萵苣種子消毒後發芽 3 天，將生長 6 天的水稻幼苗與生長 3 天的萵苣幼苗放在同一個含濾紙的培養皿裡培養 7 天。取出生長 10 天的萵苣幼苗利用數位相機拍照，並測量其胚根長度。

4. 水稻與萵苣滅菌土共培

將水稻種子（6 粒）與萵苣種子（6 粒）分別消毒發芽 3 天。將生長 3 天後的水稻幼苗與生長 3 天的萵苣幼苗，於滅菌土中共同種植 14 天（圖一）。於第 14 天將萵苣幼苗小心取出，將培養土洗除。利用數位相機拍照後，利用 IMAGE J 軟體測量萵苣幼苗的根長與株高。



圖一、水稻與萵苣種子的排他實驗。取水稻種子與萵苣種子各 6 粒，消毒後共同培養 3 天

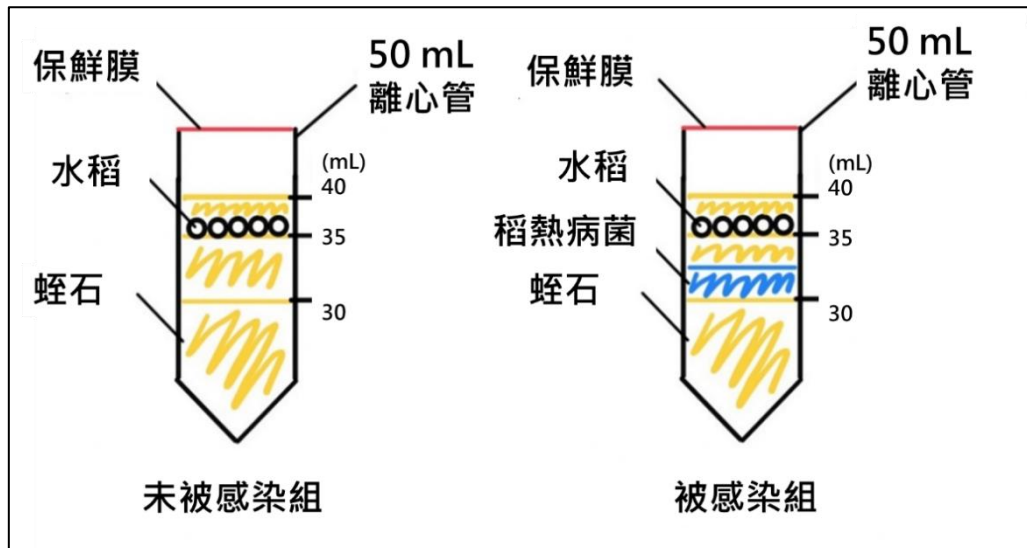
5. 生物統計分析

利用組間變異數分析 (ANOVA) 分析組間有無顯著差異 ($p < 0.05$)，若有顯著差異，再利用再以杜凱氏最誠實顯著性差異 (Tukey HSD) 進行事後檢定，分析兩兩間有無顯著差異 ($p < 0.05$)。

(二) 探討 *RePRP* 基因是否可促使植物抵禦真菌感染。

1. 水稻感染稻熱病菌

將稻熱病菌放置在 PDA 培養皿培養 14 天，將蛭石以蒸餾水浸潤完全後，填入 50 mL 的離心管至刻度 30 mL。在蛭石上方加入稻熱病菌，再填入蛭石至刻度 35 mL。將水稻種子均勻放置在蛭石上後，再以蛭石填滿至刻度 40 mL 作為真菌感染處理組。另取 1 根 50 mL 的離心管將浸潤完全的蛭石裝填至刻度 35 mL。將水稻種子均勻放置在蛭石上後，再以蛭石填滿至刻度 40 mL 作為真菌未感染處理組。將真菌感染與未感染處理組均以保鮮膜密封離心管口，一同放置於 28 °C 照光的植物生長箱培養 14 天 (圖二)。第 14 天將蛭石洗除後將水稻幼苗利用數位相機拍照。將根剪碎，利用液態氮急速冷凍，再放至 -80 °C 的冰箱保存，利用 IMAGE J 軟體測量幼根長與幼苗長。



圖二、感染與未感染真菌的水稻栽培。將稻熱病菌放置在蛭石上方，再填入蛭石，水稻種子均勻放置在蛭石上後，再以蛭石填滿至刻度 40 mL 作為真菌感染處理組。另一組則是將水稻種子均勻放置在蛭石上後，作為真菌未感染處理組。兩組均以保鮮膜密封離心管口。

2. 生物統計分析

利用組間變異數分析 (ANOVA) 分析組間有無顯著差異 ($p < 0.05$)，若有顯著差異，再利用再以杜凱氏最誠實顯著性差異 (Tukey HSD) 進行事後檢定，分析兩兩間有無顯著差異 ($p < 0.05$)。

(三) 探討不同濃度植物激素 MeJA 處理下，*RePRP* 基因是否增強幾丁質酶分解的能力。

1. 水稻培育

將水稻種子消毒發芽 3 天。第 3 天將水稻幼苗移至水耕液裡，置於 28 °C 照光生長箱中種植 7 天。分別以 10 μ M、100 μ M 茉莉酸甲酯，不同濃度的植物激素處理水稻幼苗持續 24 小時。取其根，並剪碎，先用液態氮急速冷凍，再放至 -80 °C 的冰箱保存。

2. 萃取幾丁質酶

以樣品均質機將樣品打成細碎。加入每管 500 μ L 裂解緩衝液均勻混和後，放置離心機中以 4 $^{\circ}$ C 與 13000 rpm 離心 10 分鐘後，吸取上清液。

3. Bradford 蛋白質濃度測定

將 5 μ L 萃取出上的清液和 150 μ L 的 1X Bradford 染劑加入 96 孔盤中，送入分光光度計檢測，以標準品的數據畫出標準曲線，並以標準曲線回推各樣品的濃度。

(四) 探討不同濃度植物激素 MeJA 處理下，*RePRP* 基因過表現植株，其幾丁質酶的量是否較多。

1. 水稻培育

將水稻種子消毒發芽 3 天。第 3 天將水稻幼苗移至水耕液裡，置於 28 $^{\circ}$ C 照光生長箱中種植 7 天。分別以 10 μ M、100 μ M 茉莉酸甲酯，不同濃度的植物激素處理水稻幼苗持續 24 小時。取其根，並剪碎，先用液態氮急速冷凍，再放至 -80 $^{\circ}$ C 的冰箱保存。

2. 萃取幾丁質酶

以樣品均質機將樣品打成細碎。加入每管 500 μ L 裂解緩衝液均勻混和後，放置離心機中以 4 $^{\circ}$ C 與 13000 rpm 離心 10 分鐘後，吸取上清液。

3. Bradford 蛋白質濃度測定

將 5 μ L 萃取出上的清液和 150 μ L 的 1X Bradford 染劑加入 96 孔盤中，送入分光光度計檢測，以標準品的數據畫出標準曲線，並以標準曲線回推各樣品的濃度。

4. 蛋白質電泳

以 SDS-PAGE 方式分離蛋白質，將萃取的蛋白質加入至配置好的蛋白質電泳膠體，並且電泳槽裡加入 Tris-Glycine buffer 緩衝液，再以電壓 120 V 放置 90 分鐘。

蛋白質電泳膠體配方

藥品	添加量
T-Pro Gel EZ Gel Solution	10 mL
TEMED	10 μ L
10 % APS	100 μ L

5. 西方墨點法

先將轉印模以甲醇浸濕，再將跑好的膠與轉印模以三明治法固定，壓除周邊氣泡。把固定好的裝置放於轉漬槽中，並加入 Western transfer buffer，在裝滿冰的冰槽中，以電壓 110 V 與電流 400 mA，處理 90 分鐘。再取出完成的轉印膜，加入牛奶（5 %奶粉）進行 blocking 搖晃 30 分鐘，之後倒掉原本的牛奶，再加入用牛奶（5%奶粉）稀釋 10000 倍的一次抗體在 4 °C 搖晃過夜，然後以 1X TBST 清洗三次，每次清洗 10 分鐘。接著再加入用牛奶（5 %奶粉）稀釋 10000 倍的二次抗體搖晃 30 分鐘。以上步驟重複十次後，加入酵素冷光試劑，並放入超高感度冷光數位影像系統分析數據，取出後加入考克馬斯亮藍染色，搖晃後將染劑洗至轉印模呈透明。

參、研究結果與討論

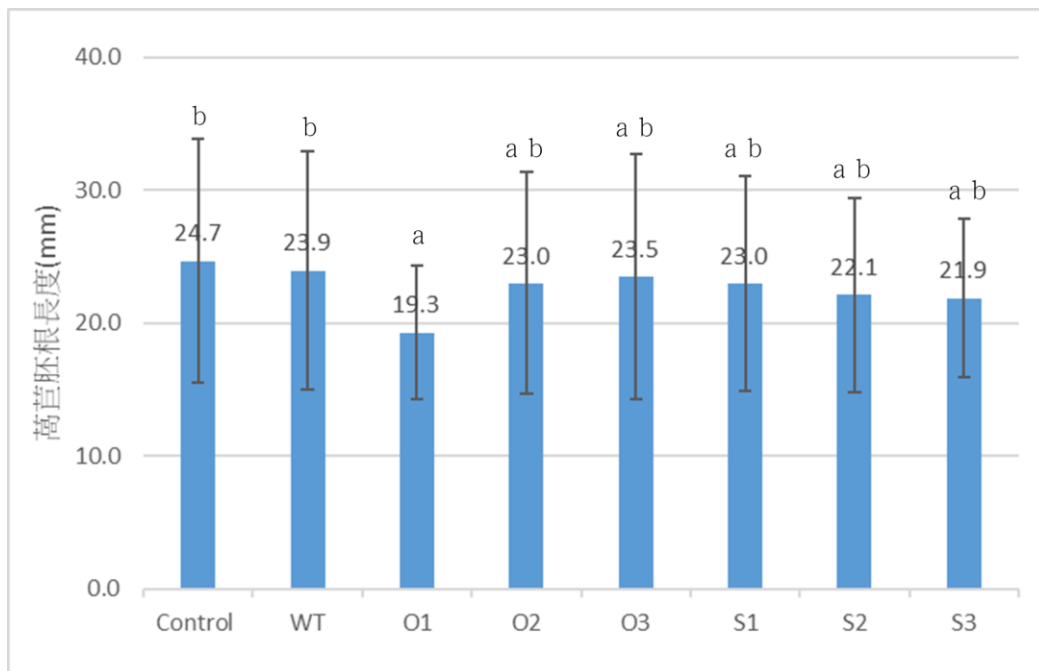
一、研究結果

(一)探討 *RePRP* 基因被誘導時是否會促進水稻的排他作用。

1. 以水稻與萵苣培養皿共培的方式，將 3 粒消毒發芽三天的水稻幼苗移至水耕液裡種植 6 天後，與 15 粒消毒發芽 3 天大的萵苣幼苗，放在同一個培養皿中照光種植 6 天後，測量萵苣胚根長的實驗結果(圖三)。其實驗結果，發現與水稻一起種植的萵苣胚根長，相較於對照組（也就是沒有跟水稻一起種植的）都會略短一些，值得關注的是，在 O1 組中是所有組別裡，萵苣胚根長最短的一組(圖四)。另外我們將數據利用生物統計進行比較，以變異數分析 (ANOVA) 後，組間有顯著差異 ($p < 0.05$, 每組 $n=60$)，再以 Tukey 進行事後比較，發現 O1 與對照組和 WT 有顯著差異。(詳細統計結果請見附錄(一)-1.)

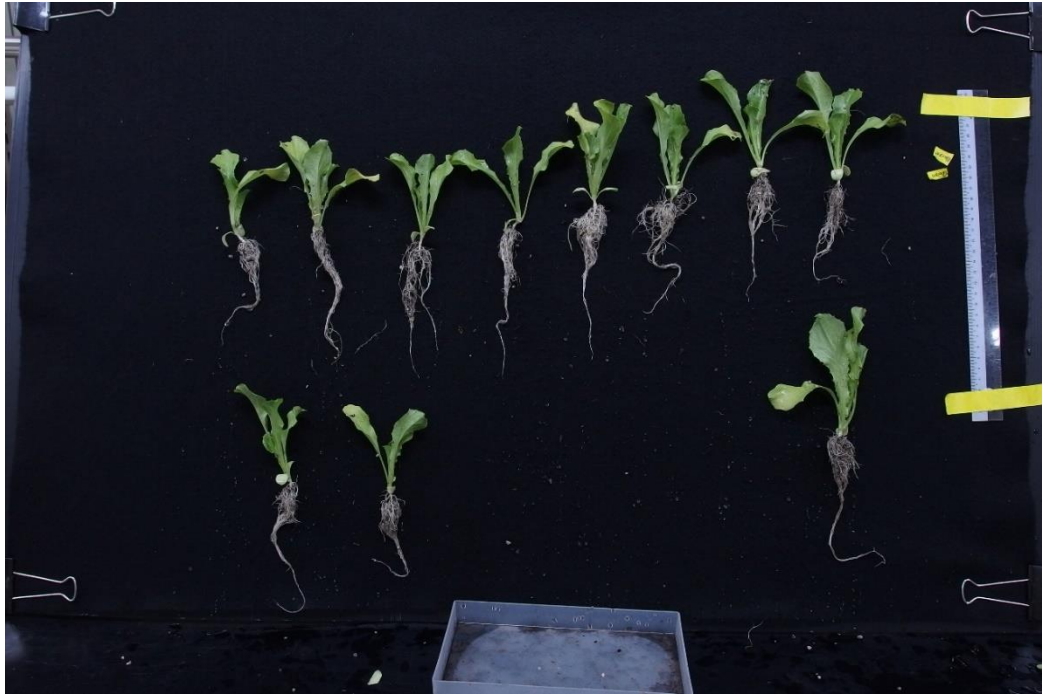


圖三、水稻與萵苣共同培養的幼苗組別

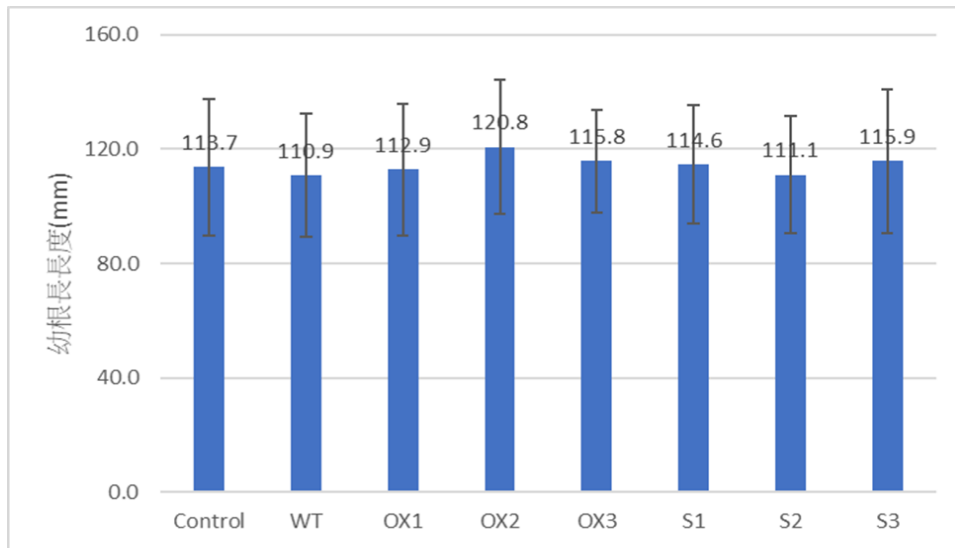


圖四、萬苳與水稻培養皿共同栽培實驗中萬苳胚根長度

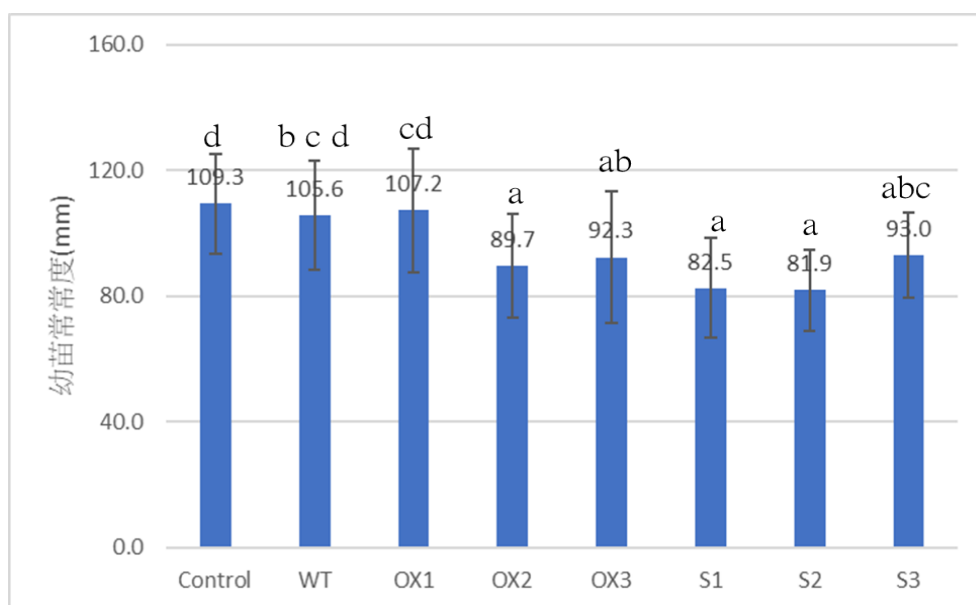
- 將 6 顆消毒發芽 3 天的水稻與同樣 6 顆消毒發芽 3 天的萬苳，共同種植在小型盆栽中 14 天(N=24)。在萬苳 17 天大時，把萬苳從土裡取出，並洗除滅菌土後，拍照測量（圖五）。並紀錄成株的根長與幼苗長度，由實驗結果發現對於萬苳的幼根長度，不管是野生種、*RePRP* 基因大量表現組還是 *RePRP* 基因抑制表現組，都沒有太大的差異（圖六、圖七）。以變異數分析（ANOVA）後，幼根組間無顯著差異（ $p > 0.05$ ），而幼苗組間有顯著差異（ $p < 0.05$ ，每組 $n=42$ ）。再以事後檢測（Tukey）可以看出，對照組、WT 組、O1 組之間沒有顯著差異，而與其他組間有顯著差異。（詳細統計結果請見附錄(一)-2、(一)-3.)



圖五、水稻與萹芎滅菌土共同培養後的成株生長情形



圖六：萹芎土耕結果（萹芎幼根長度）



圖七、萬芑土耕結果（萬芑幼苗長度）

(二)探討 *RePRP* 基因是否可促使植物抵禦真菌感染。

在將稻熱病菌與水稻一起種植 14 天後，洗除滅菌土後測量水稻幼根長與幼苗長的結果（圖八），並且記錄水稻的根長後，在被感染後，*RePRP* 基因抑制表現組的水稻幼根長，相較於野生種和 *RePRP* 基因大量表現組，明顯有比較短的趨勢，而且是在 3 組 *RePRP* 基因抑制表現組中都可以發現的。不過在野生組與 *RePRP* 基因大量表現組中，其未被感染與被感染的差異卻不明顯（圖九）。

以同樣方式記錄水稻幼苗長度，野生種與 *RePRP* 基因大量表現組的長度差不多，但都略低於 *RePRP* 基因抑制表現組的水稻幼苗長度。但在被感染後，*RePRP* 基因抑制組的水稻幼苗長度卻比野生種與 *RePRP* 基因大量表現組來的短很多。而且還可發現，不管哪一組中，被感染過的水稻幼苗長度都比未被感染過的水稻幼苗長度來的短，且 *RePRP* 基因抑制

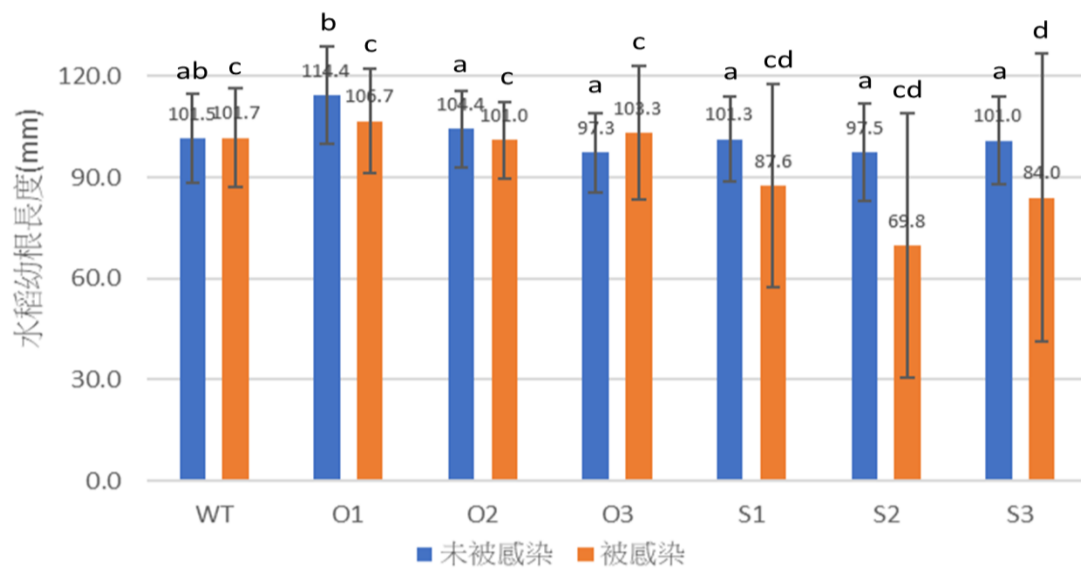
表現組的差異更是比其他組別來的大（圖十）。

再來我們以變異數分析（ANOVA）與事後檢測（Tukey）檢測可得以下幾個結果（圖九）（圖十）（詳細統計結果請見附錄(二)-1、(二)-2.）：

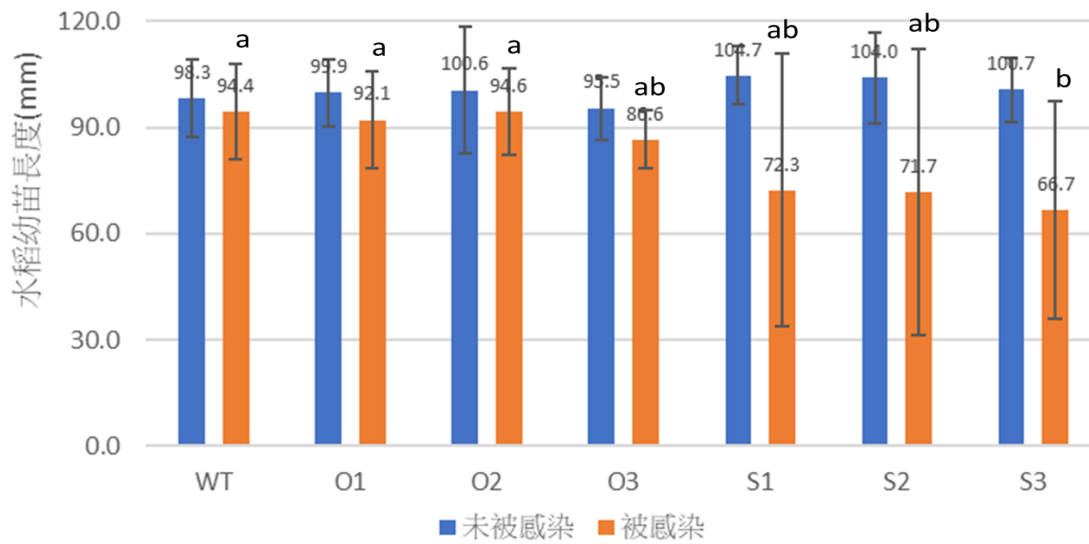
- (1.) 未感染的水稻根長只有 O1 有顯著差異。
- (2.) 被感染水稻根長中，S1, S2, S3 組間無顯著差異，而 S3 與其他四組(WT, O1, O2, O3)有顯著差異。
- (3.) 未感染的水稻苗長無顯著差異。
- (4.) 被感染的水稻苗長中，O3, S1, S2, S3 組間無顯著差異，而 S3 與其他三組(WT, O1, O2)間有顯著差異。



圖八、水稻感染稻熱病實驗水稻的生長情形



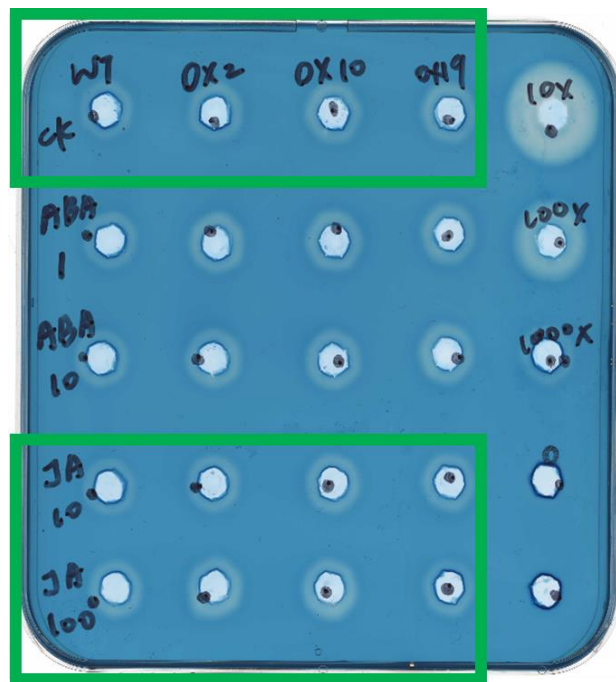
圖九、稻熱病感染實驗中水稻幼根長度



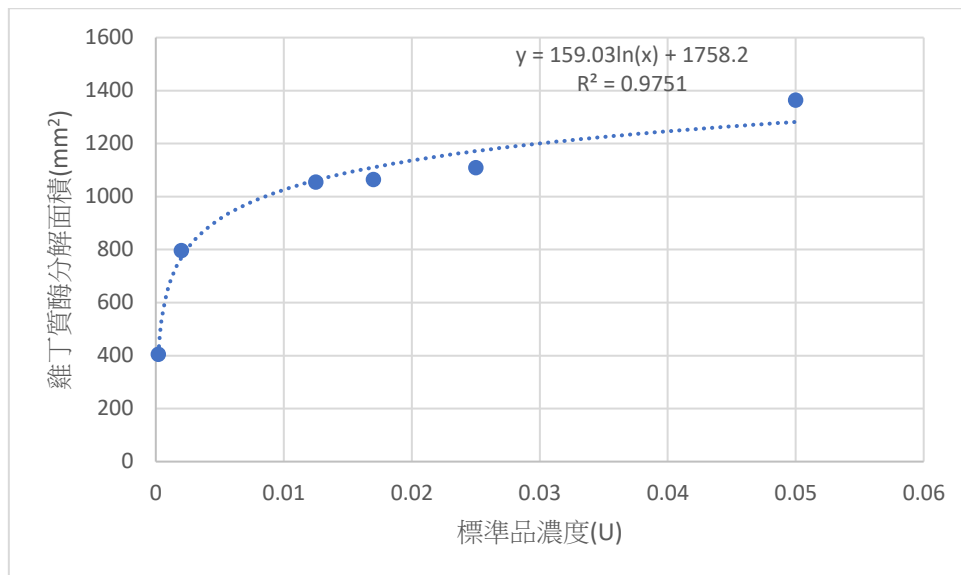
圖十、稻熱病感染實驗中水稻幼苗長度

(三)探討不同濃度植物激素 MeJA 處理下，*RePRP*基因是否增強幾丁質酶分解的能力。

1. 將幾丁質酶標準品稀釋成 1/4 倍、1/8 倍、1/12 倍、1/16 倍，加入在幾丁質膠上以 P200 微量吸管頭打的洞中，放置 16~18 小時後，加入染劑染 10 分鐘，倒除染劑並用逆滲透水清洗 2 個小時，最後測量其分解幾丁質的面積(圖十一)，並畫出散佈圖與曲線，由此圖的公式預測實驗組別的幾丁質酶濃度(圖十二)。



圖十一、圖中綠色區域為植物激素對水稻幾丁質酶分解幾丁質膠影響的實驗結果



圖十二、幾丁質酶標準品分解面積曲線圖(註:1U=0.5mg/hr，1小時分解0.5mg的幾丁質)

2. 將水稻種子消毒並發芽3天，再將水稻幼苗移至水耕液裡種植7天，第7天時，也就是水稻10天大時，以不同濃度的茉莉酸處理水稻幼苗。在不同濃度的茉莉酸處理下，記錄其幼苗生長後，取其根部並且萃取其幾丁質酶，藉由標準品分解幾丁質的表現推測其幾丁質酶的表現量(表一)，可以看到，在O1 100 μ M MeJA處理時，其幾丁質酶的濃度最高。

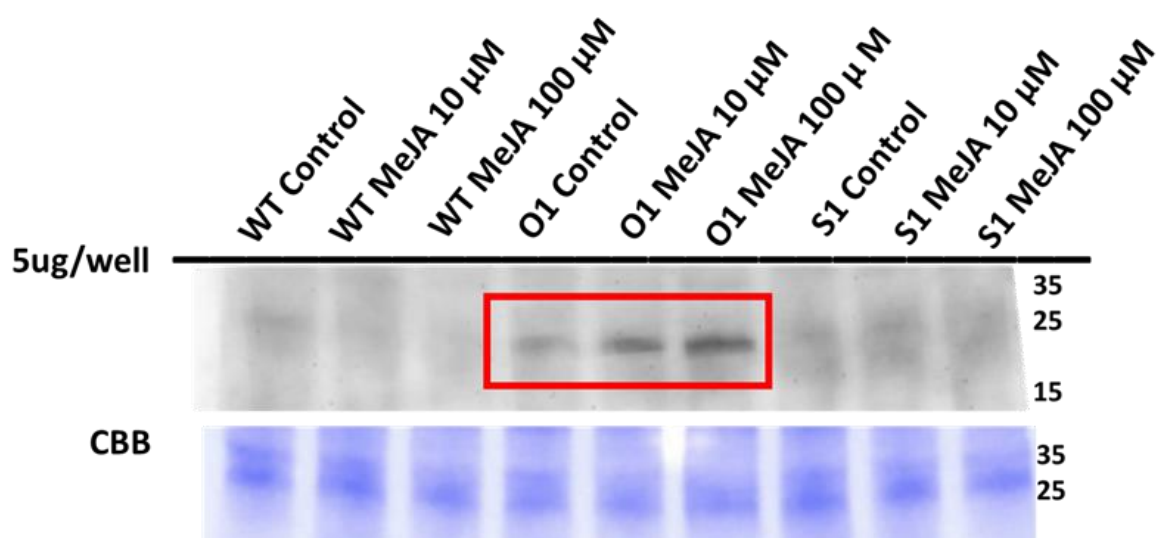
表一、以不同植株的幾丁質酶分解之面積回推其濃度。

	WT	O1	O2	O3	S1	S2	S3
Control	0.00020	0.00024	0.00031	0.00031	0.00027	0.00019	0.00020
JA 10 μ M	0.00021	0.00020	0.00023	0.00029	0.00022	0.00014	0.00019
JA 100 μ M	0.00024	0.00033	0.00026	0.00026	0.00024	0.00018	0.00026

(四)探討不同濃度植物激素 MeJA 處理下，*RePRP* 基因過表現植株，其幾丁質酶的量是否較多。

接著將水稻種子消毒並發芽3天，再將水稻幼苗移至水耕液裡種植7天，第7天時，也就是水稻10天大時，以不同濃度的茉莉酸處理水稻幼苗。處理

24 小時後將其根取下，並萃取根部的蛋白質，進行蛋白質電泳與西方墨點法測定其幾丁質酶的量，從實驗結果可知，在 *RePRP* 基因大量表現的組別裡，被茉莉酸誘導的幾丁質酶的量確實比野生種與 *RePRP* 基因抑制表現組還要多，且隨著茉莉酸濃度的增加，幾丁質酶的量也隨之增加（圖十三）。



圖十三、以西方點墨法處理不同濃度的 MeJA 處理不同組別水稻的幾丁質酶結果。

二、討論

在本實驗中以萵苣與水稻共同生長，藉此欲探討，水稻表現 *RePRP* 基因時對於萵苣生長，是否會呈現植物排他作用，在實驗中發現與 *RePRP* 基因表現株水稻共同生長的萵苣幼苗，其根部會較對照組的略短一些，且以統計分析後發現，*RePRP* 基因表現株 O1 與野生型及對照組有顯著差異，因此推測 *RePRP* 基因與水稻的排他作用有關。

在真菌感染的實驗中，以水稻常感染的稻熱病為真菌感染者，發現當水稻被稻熱病真菌感染後，*RePRP* 基因抑制表現組的水稻幼苗及幼根長度，

較野生種和 *RePRP* 基因大量表現組為短，且以統計分析後發現 *RePRP* 基因抑制表現組與其他兩組有顯著差異，而野生組與 *RePRP* 基因大量表現組無顯著差異。因此 *RePRP* 基因對於水稻抵禦真菌感染，相較於該基因被抑制的植株，根部會長得比較好。而植物常以增加幾丁質酶的方式抵制真菌感染，因此以測定幾丁質酶當作植物抵制真菌感染的能力，並且以幾丁質酶分解幾丁質的表現量，當作該酵素的表現能力。

在以不同濃度植物激素 MeJA 的處理實驗中，發現 *RePRP* 基因表現株的水稻幼苗根部的幾丁質酶分解能力較野生型及抑制組高，因此推測 *RePRP* 基因過表現的水稻，相較於 *RePRP* 基因被抑制的水稻，可產生較多的幾丁質酶。並且以西方點墨法測定其幾丁質酶的量，發現 *RePRP* 基因過表現的植株，相較於野生型以及 *RePRP* 基因被抑制的植物，確實有較多的幾丁質酶。因此推測當真菌感染時，水稻體內的 JA 濃度上升，活化 *RePRP* 基因，使水稻抵抗真菌。且具有 *RePRP* 基因過表現的植株，可能產生較多的幾丁質酶，進而協助植物抵禦真菌的感染。

目前本實驗發現 *RePRP* 基因過表現的水稻植株，其排他能力以及產生幾丁質酶的能力都較野生型以及 *RePRP* 抑制株的好，並且發現以 JA 可誘導 *RePRP* 基因過表現株產生較多的幾丁質酶，因此未來將繼續研究其誘導機制。

肆、結論與應用

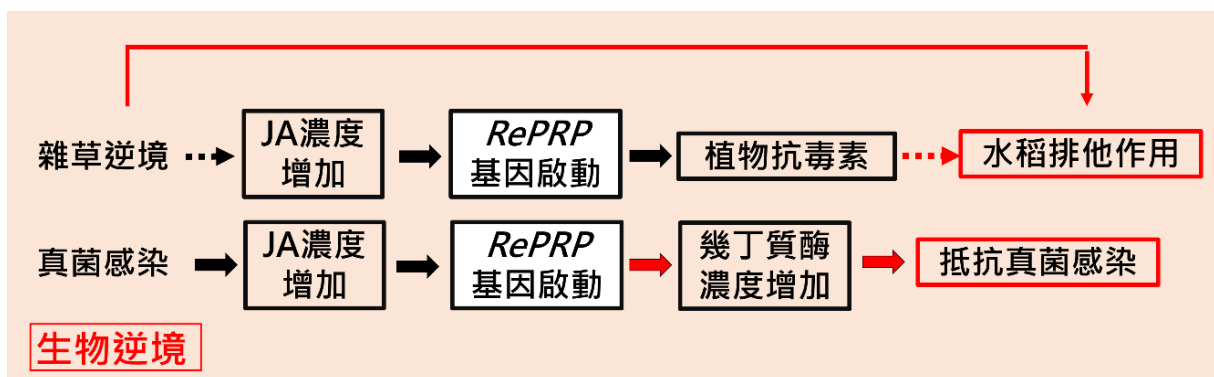
一、 結論

(一)*RePRP* 基因表現株水稻共同生長的萵苣幼苗，其根部會較度對照組的略短一些，因此推測 *RePRP* 基因可能使得水稻分泌某些物質如植物抗毒素，以抑制其他植物生長。

(二)*RePRP* 基因對於水稻抵禦真菌感染，相較於該基因被抑制的植株，根部會長得比較好，因此推測 *RePRP* 基因表現株較一般野生型水稻會有較佳的防禦能力。

(三)具有 *RePRP* 基因表現株的水稻，以植物激素 MeJA 處理後，相較於 *RePRP* 基因被抑制的植物，會產生較多的幾丁質酶，推測可能 MeJA 可誘導 *RePRP* 基因表現株產生較多的幾丁質酶。

(四)綜合以上結果與討論以及前人研究，推測真菌感染後 MeJA 濃度增加，會誘導 *RePRP* 基因表現，造成幾丁質酶濃度增加，協助水稻抵抗真菌感染。與其他雙子葉共同栽培時，推測水稻植物體內的 MeJA 濃度會增加，誘導 *RePRP* 基因表現，使水稻分泌植物抗毒素，用以水稻進行排他作用。



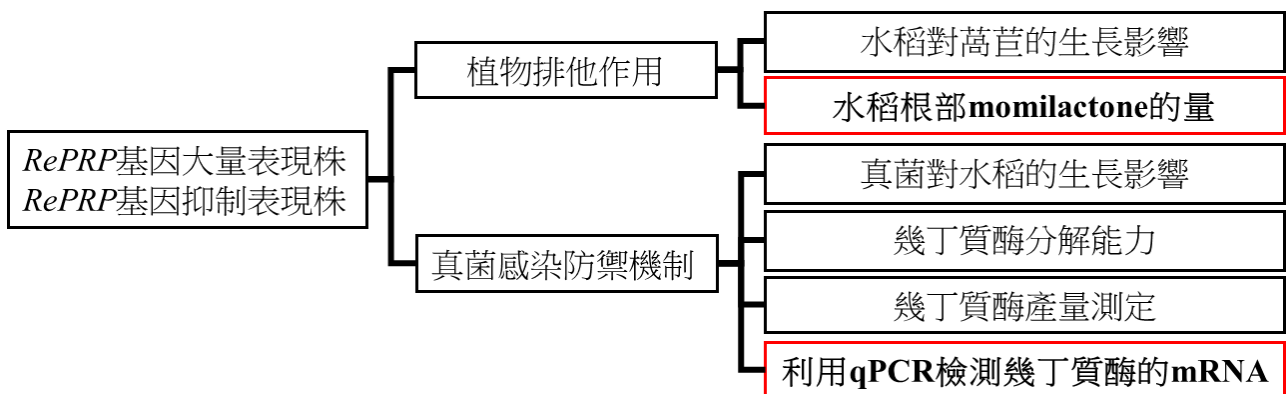
二、 應用方向

全球氣候變遷，而人口也隨著時間不停成長，糧食的產量也成為不可不重視的議題。水稻是許多亞洲地區人口重要的主食，如果證實了 *RePRP* 基因與水稻抗生物逆境有關，且在實際與雜草、真菌共培後有相當的效果，那便可結合前人的研究成果，也就是 *RePRP* 基因能有效抗非生物逆境，打造出可以有效防止生物與非生物逆境的水稻，增加稻米的收成，解決糧食的問題。

另外，水稻容易因為感染稻熱病的真菌而影響收穫，因此我們想藉由了解 *RePRP* 基因對抗生物逆境的生理機制，從中找到加強水稻抵抗真菌感染能力的方法，期待可以幫助在農業上改良水稻對抗真菌感染，用以增加水稻的產量，解決人類糧食短缺的問題。

未來將以以下兩點為主要實驗方向：

- (一)利用不同濃度的 MeJA 處理水稻，萃取其根部的 momilactone，測量 *RePRP* 基因過表現水稻的 momilactone 濃度。
- (二)利用不同濃度的 MeJA 處理水稻，萃取其根部的 momilactone，測量 *RePRP* 基因過表現水稻的 momilactone 濃度。



伍、參考資料(文獻)及其他

一、 參考文獻

1. Bi H.H., Zeng R.S., Su L.M., An M., Luo S.M., (2007). Rice Allelopathy Induced by Methyl Jasmonate and Methyl Salicylate. *Journal of Chemical Ecology*. 33(5): 1089-103. doi:10.1007/s10886-007-9286-1
2. Zou X., Nonogaki,H., Gregory E Welbaum, (2002). A gel diffusion assay for visualization and quantification of chitinase activity. *Mol Biotechnol*. 22(1): 19-23. Doi:10.1385/MB:22:1:019
3. Tseng I.C., Hong C.Y., Yu S.M., Ho T.H.D., (2013). Abscisic acid- and stress-induced highly proline-rich glycoproteins regulate root growth in rice. *Plant Physiol*. 163(1):118-34. doi: 10.1104/pp.113.217547.
4. Kumar M., Brar A.,Yadav M., Chawade A., Vivekanand V., Pareek N., (2018). Chitinase--Potential Candidates for Enhanced Plant Resistance towards Fungal Pathogens. *Agriculture*. 8,88.doi:10.3390.
5. Noguchi H.K., Peter R.J., (2013). The Role of Momilactone in Rice Allelopathy. *Journal of Chemical Ecology*. 39:175-185. Doi: 10.1007/s10886-013-0236-9.
6. Renl C.G. and Dai C.C., (2012). Jasmonic acid is involved in the signaling pathway for fungal endophyte-induced volatile oil accumulation of *Atractylodes lancea* plantlets. *BMC Plant Biol*. 12(128). doi: 10.1186/1471-2229-12-128.

二、 附錄

(一) 探討 RePRP 基因被誘導時是否會促進水稻的排他作用。

1. 以變異數分析各組間萬苳幼苗胚根長度是否有差異。

變異數分析

VAR00002

	平方和	df	均方	F	顯著性
群組之間	1130.590	7	161.513	2.585	.013
組內	29433.143	471	62.491		
總計	30563.733	478			

多重比較

依變數: VAR00002

	(I) VAR00001	(J) VAR00001	平均值差異 (I-J)	標準誤	顯著性	95% 信賴 下界
Tukey HSD	1.00	2.00	.74198	1.44937	1.000	-3.6708
		3.00	5.39400 [*]	1.44937	.005	.9812
		4.00	1.68193	1.44937	.943	-2.7308
		5.00	1.19905	1.44937	.992	-3.2137
		6.00	1.69624	1.45545	.941	-2.7350
		7.00	2.57460	1.44347	.632	-1.8202
		8.00	2.80078	1.44937	.529	-1.6120
		2.00	1.00	-.74198	1.44937	1.000
	3.00		4.65202 [*]	1.44327	.029	.2578
	4.00		.93995	1.44327	.998	-3.4542
	5.00		.45707	1.44327	1.000	-3.9371
	6.00		.95426	1.44937	.998	-3.4585
	7.00		1.83262	1.43734	.908	-2.5435
	8.00		2.05880	1.44327	.845	-2.3354
	3.00		1.00	-5.39400 [*]	1.44937	.005
		2.00	-4.65202 [*]	1.44327	.029	-9.0462
		4.00	-3.71207	1.44327	.169	-8.1063
		5.00	-4.19495	1.44327	.074	-8.5891
		6.00	-3.69776	1.44937	.177	-8.1105
		7.00	-2.81940	1.43734	.509	-7.1955
		8.00	-2.59322	1.44327	.623	-6.9874

4.00	1.00	-1.68193	1.44937	.943	-6.0947
	2.00	-.93995	1.44327	.908	-5.3341
	3.00	3.71207	1.44327	.169	-.6821
	5.00	-.48288	1.44327	1.000	-4.8771
	6.00	.01431	1.44937	1.000	-4.3985
	7.00	.89267	1.43734	.999	-3.4835
	8.00	1.11885	1.44327	.994	-3.2753
5.00	1.00	-1.19905	1.44937	.992	-5.6118
	2.00	-.45707	1.44327	1.000	-4.8513
	3.00	4.19495	1.44327	.074	-.1992
	4.00	.48288	1.44327	1.000	-3.9113
	6.00	.49719	1.44937	1.000	-3.9156
	7.00	1.37555	1.43734	.980	-3.0006
	8.00	1.60173	1.44327	.955	-2.7925

2. 以變異數分析各組間萵苣幼根長度是否有差異。

變異數分析

VAR00003

	平方和	df	均方	F	顯著性
群組之間	1665.275	7	237.896	.483	.846
組內	91156.382	185	492.737		
總計	92821.657	192			

3. 以變異數分析各組間萵苣幼苗長度是否有差異。

變異數分析

VAR00003

	平方和	df	均方	F	顯著性
群組之間	19808.401	7	2829.772	10.127	<.001
組內	51971.872	186	279.419		
總計	71780.274	193			

多重比較

依變數: VAR00003

		(I) VAR00001	(J) VAR00001	平均值差異 (I-J)	標準誤	顯著性	95% 信賴... 下界
Tukey HSD	1.00	2.00		2.92921	4.73174	.999	-11.5772
		3.00		1.33121	4.73174	1.000	-13.1752
		4.00		18.85166 [*]	4.78493	.003	4.1822
		5.00		16.21375 [*]	4.73174	.017	1.7074
		6.00		26.01950 [*]	4.73174	<.001	11.5131
		7.00		26.64242 [*]	4.73174	<.001	12.1360
		8.00		15.50928 [*]	4.68227	.024	1.1546
		2.00	1.00		-2.92921	4.73174	.999
	3.00			-1.59800	4.82544	1.000	-16.3917
	4.00			15.92245 [*]	4.87761	.028	.9689
	5.00			13.28454	4.82544	.114	-1.5091
	6.00			23.09029 [*]	4.82544	<.001	8.2966
	7.00			23.71321 [*]	4.82544	<.001	8.9196
	8.00			12.58007	4.77694	.151	-2.0649
	3.00	1.00		-1.33121	4.73174	1.000	-15.8376
	2.00			1.59800	4.82544	1.000	-13.1957
	4.00			17.52045 [*]	4.87761	.010	2.5669
	5.00			14.88254 [*]	4.82544	.047	.0889
	6.00			24.68829 [*]	4.82544	<.001	9.8946
	7.00			25.31121 [*]	4.82544	<.001	10.5176
	8.00			14.17807	4.77694	.065	-.4669
	4.00	1.00		-18.85166 [*]	4.78493	.003	-33.5211
	2.00			-15.92245 [*]	4.87761	.028	-30.8760
	3.00			-17.52045 [*]	4.87761	.010	-32.4740
5.00			-2.63790	4.87761	.999	-17.5915	
6.00			7.16785	4.87761	.823	-7.7857	
7.00			7.79076	4.87761	.751	-7.1628	
8.00			-3.34238	4.82964	.997	-18.1489	
5.00	1.00		-16.21375 [*]	4.73174	.017	-30.7201	
2.00			-13.28454	4.82544	.114	-26.0782	

(二) 探討 RePRP 基因是否可促使植物抵禦真菌感染。

1. 以變異數的單變量分析被稻熱病感染後的水稻根部長度是否有差異。

受試者間因子			受試者間效應項檢定					
			依變數: VAR00003					
		N	來源	第 III 類平方和	df	均方	F	顯著性
VAR00001	1.00	38	修正的模型	30652.074 ^a	13	2357.852	5.126	<.001
	2.00	40	截距	2520415.146	1	2520415.146	5479.941	<.001
	3.00	40	VAR00001	17465.230	6	2910.872	6.329	<.001
	4.00	39	VAR00002	5358.758	1	5358.758	11.651	<.001
	5.00	31	VAR00001 * VAR00002	7490.533	6	1248.422	2.714	.014
	6.00	39	錯誤	115443.625	251	459.935		
	7.00	38	總計	2698278.611	265			
VAR00002	.00	131	校正後總計	146095.698	264			
	1.00	134						

a. R 平方 = .210 (調整的 R 平方 = .169)

		VAR00003				
		VAR00001	N	子集		
				1	2	3
Student-Newman-Keuls 多重 比較法 ^{a,b,c}	6.00	39	83.3296			
	7.00	38	92.0254	92.0254		
	5.00	31		95.1398		
	4.00	39		100.3906	100.3906	
	1.00	38		101.6304	101.6304	
	3.00	40		102.7299	102.7299	
	2.00	40				110.5945
	顯著性			.080	.197	.168

2. 以變異數的單變量分析被稻熱病感染後的水稻幼苗長度長度是否有差異。

受試者間因子			受試者間效應項檢定					
			依變數: VAR00007					
		N	來源	第 III 類平方和	df	均方	F	顯著性
VAR00005	1.00	38	修正的模型	37715.918 ^a	13	2901.224	7.513	<.001
	2.00	40	截距	2201011.341	1	2201011.341	5699.637	<.001
	3.00	40	VAR00005	6262.960	6	1043.827	2.703	.015
	4.00	39	VAR00006	20975.978	1	20975.978	54.318	<.001
	5.00	31	VAR00005 * VAR00006	11146.272	6	1857.712	4.811	<.001
	6.00	39	錯誤	96927.903	251	386.167		
	7.00	38	總計	2361705.971	265			
VAR00006	.00	131	校正後總計	134643.821	264			
	1.00	134						

a. R 平方 = .280 (調整的 R 平方 = .243)

		VAR00007			
			子集		
	VAR00005	N	1	2	3
Tukey HSD ^{a,b,c}	7.00	38	82.8022		
	6.00	39	87.4378	87.4378	
	5.00	31	90.0476	90.0476	
	4.00	39	90.9404	90.9404	
	2.00	40	96.0044	96.0044	
	1.00	38	96.2034	96.2034	
	3.00	40		97.5707	
	顯著性		.052	.280	

【評語】 060009

- 一、此研究顯示與萬苳共同種植或受稻熱菌感染時，稻米會藉由提高 *RePRP* 基因表現量，達到排他或防禦真菌型疾病的作用。
- 二、作者亦發現水稻真菌防禦可能藉由 MeJA 提高 *RePRP* 基因表現，進而增加能水解真菌細胞壁的幾丁質酶總量，降低水稻受真菌感染。
- 三、本研究主題明確、實驗設計及分析方法具科學適切性，亦具有未來應用價值。
- 四、*RePRP* 基因過量表現轉殖植株及基因靜默植株對萬苳生長的影响相似，因此 *RePRP* 基因的功能有待釐清來源。