

# 2025年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

|      |                       |
|------|-----------------------|
| 作品編號 | 060010                |
| 參展科別 | 植物學                   |
| 作品名稱 | 探討候選基因對角質層與氣孔發育的調控之影響 |

|      |                |
|------|----------------|
| 就讀學校 | 國立臺灣師範大學附屬高級中學 |
| 指導教師 | 何金敏<br>羅尹廷     |
| 作者姓名 | 徐貫維<br>陳詩耘     |

|     |                                                                 |
|-----|-----------------------------------------------------------------|
| 關鍵詞 | <u>氣孔、角質層、全基因體關聯性分析 (Genome-Wide Association Studies, GWAS)</u> |
|-----|-----------------------------------------------------------------|

## 作者簡介



大家好，我們是來自國立台灣師範大學附屬高級中學的陳詩耘、徐冠維。我們熱愛探索科學的奧秘，並期待與來自世界各地的科學家們交流和學習。希望能在這裡結識志同道合的朋友，共同推動科學的發展。謝謝大家！

# 2025年台灣國際科學展覽會

## 研究報告

區 別：

科 別：植物學科

計畫名稱：探討候選基因對角質層與氣孔發育的調控之影響

關 鍵 詞：氣孔、角質層、全基因體關聯性分析（Genome-Wide Association Studies, GWAS）

編 號：

## 中文摘要

植物進化成陸生植物的過程中，氣孔和角質層是關鍵特徵。氣孔由保衛細胞調控，負責二氧化碳進入和水分蒸發；角質層則保護植物免受水分流失及環境壓力。調控這些特徵的基因尚不明確。本研究利用全基因組關聯分析（GWAS）探討阿拉伯芥的角質層和氣孔發育。GWAS 結果顯示，與角質層厚度相關的基因位於第二條染色體，而與二氧化碳吸收效率相關的基因位於第五條染色體。氣孔導度和水分吸收效率的調控基因可能在第一、三、四條染色體上。角質層變薄時，氣孔密度下降，導致氣孔導度和水分蒸散率上升；而當角質層通透性增加到一定程度時，二氧化碳固定效率達飽和。此外，透過反向遺傳學篩選候選基因，研究特定基因對角質層合成及光合作用效率的影響。突變株分析顯示，抑制控制角質層或氣孔的基因會促進另一性狀的表現，未來可進一步探討自然族群中相關基因的功能。

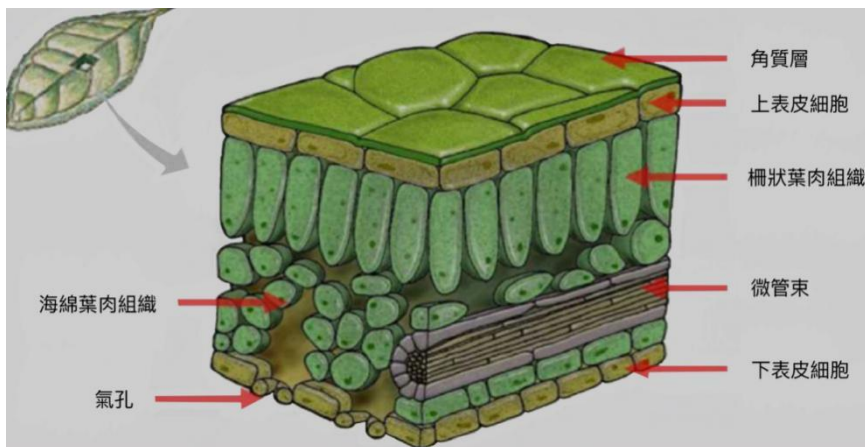
## Abstract

Plant epidermal stomata controls water evaporation and gas exchange for photosynthesis in plants. Leaf cuticle forms a physical barrier to protect plant from dehydration. In order to identify the factors involved in the formation of stomata and cuticular layer, we firstly performed genome-wide association study (GWAS) to understand the genetic basis of leaf developmental traits such as cuticle permeability and stomatal conductance in a collection of 88 *Arabidopsis* ecotypes originated from regions including Asia and Europe. We have identified significant peak located on chromosome 2 associated to cuticle permeability. For leaf-level gas-exchange measurements, significant peak on chromosome 5 associated with carbon dioxide assimilation. There are multiple significant sites founded to be associated with stomatal conductance and transpiration, and more samples might be needed to detect the significant site for stomata density as its association results appeared to be controlled by multiple loci with non-significant effect. The phenotype correlation shows that when cuticle permeability is high i.e. thin cuticle, stomatal density is reduced and the leaf-level gas-exchange including  $g_{sw}$  (stomatal conductance to water) and  $E$  (transpiration rate) will be increased. However, there will be a plateau for  $A$  while the cuticle permeability is increasing, suggesting a negative correlation between cuticle permeability with stomata density. In addition, to identify players involved in cuticle biosynthesis, we have identified twelve potential candidates involved in cuticle biosynthesis based on the transcriptome data from our lab and publicly available single-cell RNA-seq datasets. In addition to the cuticle permeability, the cuticle biosynthesis mutants exhibit different leaf-level gas-exchange measurements to the wild-type, suggesting the impaired cuticle might affect the carbon assimilation and transpiration. We also observed the negative correlation between cuticle permeability with stomata density for some of the mutants. The results will provide insights to the study on how to regulate the cuticle thickness and stomata density for a improved water usage efficiency.

## 壹、前言

### 一、研究動機

氣孔由一對保衛細胞組成，它們能透過氣孔的開合進行水分的蒸散，也能吸收二氧化碳以利光合作用的進行。角質層主要由角質和蠟質組成，它能有效地隔絕外部環境，防止植物表皮的水分散失過多，也可抵禦生物與非生物逆境（圖一）。因此，為了提高植物的耐旱性和二氧化碳吸收效率，探討調節氣孔和角質層的基因是非常重要的。本篇研究中，我們進行了一項全基因體關聯性分析（Genome-wide Association Studies, GWAS），蒐集來自亞洲和歐洲等地區的 88 個阿拉伯芥生態型以探討葉片角質層和氣孔表現的關聯性基因。使用 GWAS 的第一個優勢在於它可以同時檢測眾多不同生態型之間遺傳變異，這可能在自然族群中具有廣泛的重要性。其次，在 GWAS 中所使用的高密度的全基因體單核苷酸多態性（Single Nucleotide Polymorphism, SNP）可以幫助探勘與目標性狀有顯著關聯的基因。

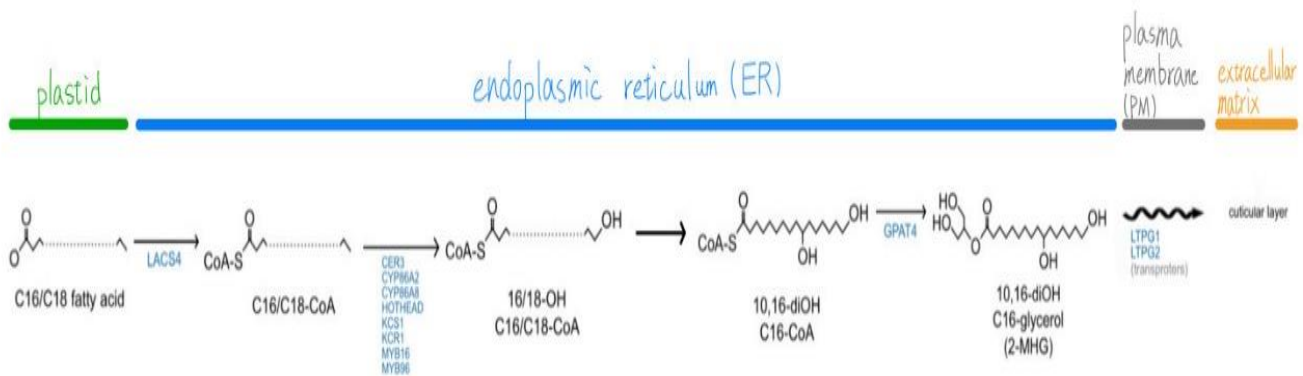


圖一、葉片剖面示意圖（圖片來源：<https://reurl.cc/QEqN1Z>）

Kong 等人(2020)對參與角質層合成的同源基因進行了全面的演化分析，並將這些基因分成角質合成、角質蠟形成、運輸和調節等不同組別。在植物細胞中，質體經由轉錄轉譯產生脂肪酸，於內質網經由一系列基因作用下轉化成酸酯，最後形成蠟質並運輸至細胞膜外堆積形成角質層，角質層合成路徑示意圖如圖二。Kong 等人對參與角質層合成的同源基因進行了全面的演化分析，並將這些基因分成四群，第 1 群為角質合成(LACS、CYP86A、CYP77A、HOTHEAD、

GPAT、CUS、BDG、DCR、CYP98A、DCF、EH1 共 11 個）、第 2 群為蠟合成群（LACS、KCS、KCR、HCD、ECR、CER1、CER2、CER3、CER4、CYTB5、MAH、CER17、WSD 共 13 個）、第 3 群為運輸群（GNL1、ECH、ABCG、LTPG 共 4 個）及第 4 群為調節群（SHN、NFXL2、MYB、HDG1、CER7、CER9、SAGL1 共 7 個）（2020）。其中本實驗室也發現 MYB16 於葉表皮幹細胞（Protodermal cell）中表現，藉由參與角質層進而調控氣孔發育，以達到角質層與氣孔數量的平衡（Yang *et al.*, 2022）。

Lopez-Anido 等人(2021)使用單細胞轉錄組學方法，研究了阿拉伯芥葉片中氣孔結構的動態發展。從此單細胞轉錄組學中，實驗室同仁檢查了位於氣孔、分生細胞或處於轉化過程的細胞中表現的角質合成基因。此外，由實驗室前人的誘導 MYB16 表現的 RNA 定序中，我們亦檢查了在氣孔結構中高度表現的基因。綜合以上研究的結果分析，本研究最終選擇了 12 個基因（CER3、CYP86A2、CYP86A8、GPAT4、LACS4、HOTHEAD、KCR1、KCS1、LTPG1、LTPG2、MYB96、MYB16，表一），結合正向以及反向遺傳學的方法，評估這些基因對氣孔發育和角質層厚度的影響。



圖二、參與角質層生成路徑的基因（藍色標示）（註:自行繪製）

表一、調控角質層之基因列表（註:自行繪製）

| 編號 | 基因      | 功能                               | 文獻                                                                     |
|----|---------|----------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| 1  | CER3    | 從 FAE 釋放脂肪酸                      | Jenks <i>et al.</i> , 1995                                             |
| 2  | CYP86A2 | 內質網生物合成步驟：ω-羥基化                  | Yang <i>et al.</i> , 2022                                              |
| 3  | CYP86A8 |                                  |                                                                        |
| 4  | GPAT4   | 催化 Acyl-CoA 前驅物                  |                                                                        |
| 5  | LACS4   | 將 C16/C18 脂肪酸轉化成<br>Acyl-CoA 前驅物 |                                                                        |
| 6  | HOTHEAD | 與角質層滲透相關                         | Krolikowski <i>et al.</i> ,<br>2003; Kurdyukov<br><i>et al.</i> , 2006 |
| 7  | KCR1    | 將 β-酮基還原為醇，並生成<br>羥基酰基輔酶 A       | Batsale <i>et al.</i> , 2021                                           |
| 8  | KCS1    | 催化酰基輔酶 A 轉化為<br>β-酮基酰基輔酶 A       |                                                                        |
| 9  | LTPG1   | 增厚蠟質                             | Fich <i>et al.</i> , 2016                                              |
| 10 | LTPG2   |                                  |                                                                        |
| 11 | MYB96   | 生成角質                             |                                                                        |
| 12 | MYB16   |                                  |                                                                        |

## 二、研究目的

（一）針對不同來源的阿拉伯芥生態型之間，探討其角質層對於光合作用效率與氣孔表現的關係。

（二）從角質層生合成路徑篩選調控基因，探討特定基因對角質層發育及光合作用效率和氣孔表現的功能。

## 貳、研究設備與器材

### 一、實驗生物材料

#### (一) 阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*)

蒐集到的阿拉伯芥不同生態型 (ecotype) 共 167 種 (圖三)，選擇其中不具重複的 88 種作為實驗對象。



圖三、蒐集到的阿拉伯芥生態型來源地 (註:自行繪製)

(二) 針對葉表皮角質層生成路經的十二個調控基因 (圖二，表一)，於 *Arabidopsis* Biological Resource Center (<https://abrc.osu.edu>) 種子庫中，採購在這些基因中具有變異的突變株。針對上述十二個相關基因，採購得的變異株如下表二。

表二、角質層生合成路徑相關基因之突變株列表 (註:自行繪製)

| 編號 | 基因      | 突變株編號                         |
|----|---------|-------------------------------|
| 1  | CER3    | SAIL_832_E06 (CS877205)       |
| 2  |         | SALK_020265                   |
| 3  |         | CS33                          |
| 4  | CYP86A2 | WiscDsLoxHs075_04A (CS907129) |
| 5  |         | SALK_005826C                  |
| 6  |         | SALK_101120                   |
| 7  | CYP86A8 | WiscDsLox387B09 (CS853921)    |
| 8  |         | SALK_062881C                  |
| 9  | GPAT4   | SAIL_189_D06 (CS808911)       |
| 10 |         | SALK_136889C                  |

|    |         |                              |
|----|---------|------------------------------|
| 11 |         | SALK_150886C                 |
| 12 | HOTHEAD | SALK_019460                  |
| 13 |         | SALK_024611                  |
| 14 |         | CS24887                      |
| 15 | KCR1    | SALK_063767                  |
| 16 |         | SALK_074735                  |
| 17 |         | SALK_143503C                 |
| 18 | KCS1    | SALK_074123                  |
| 19 |         | SALK_200839C                 |
| 20 | LACS4   | SALK_101543C                 |
| 21 |         | SALK_120357C                 |
| 22 |         | SALK_140210                  |
| 23 | LTPG1   | SAIL_1055_G03C (CS867530)    |
| 24 |         | CS68114                      |
| 25 | LTPG2   | SALK_009930C                 |
| 26 |         | SALK_100010C                 |
| 27 |         | CS71736                      |
| 28 | MYB96   | SAIL_815_G07 (CS879755)      |
| 29 |         | SALK_111645                  |
| 30 |         | SALK_128272                  |
| 31 | MYB16   | WiscDsLox507D08 (CSCS859329) |

## 二、實驗器材

### (一) 葉表皮角質層厚度測試

#### 1. 甲苯胺藍 (Toluidine Blue) 染劑

| 藥品                    | 添加量(每 100mL) |
|-----------------------|--------------|
| 甲苯胺藍 (Toluidine Blue) | 50mg         |
| Tween 20 界面活性劑        | 100 $\mu$ L  |
| 蒸餾水                   | 100mL        |

#### 2. 液態氮

#### 3. 96 孔分析盤

#### 4. 盤式分光光度計

## （二）基因型鑑定分析（Genotyping）與聚合酶連鎖反應（PCR）

### 1.DNA 樣本

| 藥品                     | 每 100 $\mu$ L 添加量（ $\mu$ L） |
|------------------------|-----------------------------|
| Edwards Solution (10X) | 10                          |
| TE buffer              | 90                          |

### 2.Mastermix2X

### 3.蒸餾水

### 4.PCR 反應

| 試劑                           | 每 10 $\mu$ L 之添加量（ $\mu$ L） |
|------------------------------|-----------------------------|
| 2X MasterMix                 | 5                           |
| Forward Primer (10 $\mu$ M)  | 0.5                         |
| Reverse Primer(10 $\mu$ M)   | 0.5                         |
| Universal Primer(10 $\mu$ M) | 0.5                         |
| DNA 樣本                       | 0.5                         |
| 蒸餾水                          | 3                           |

## 5.96 孔溫度梯度聚合酶連鎖反應儀（CLUBIO）

### 6.瓊脂凝膠

| 試劑          | 添加量 |
|-------------|-----|
| 瓊脂（Agarose） | 1 % |
| TAE buffer  | 30L |

### 7.TAE 緩衝液（TAE buffer）

### 8.電泳影響分析擷取系統

## （三）光合作用效率、氣孔蒸散的測量

### 1.攜帶式光合作用系統（LI-6800）

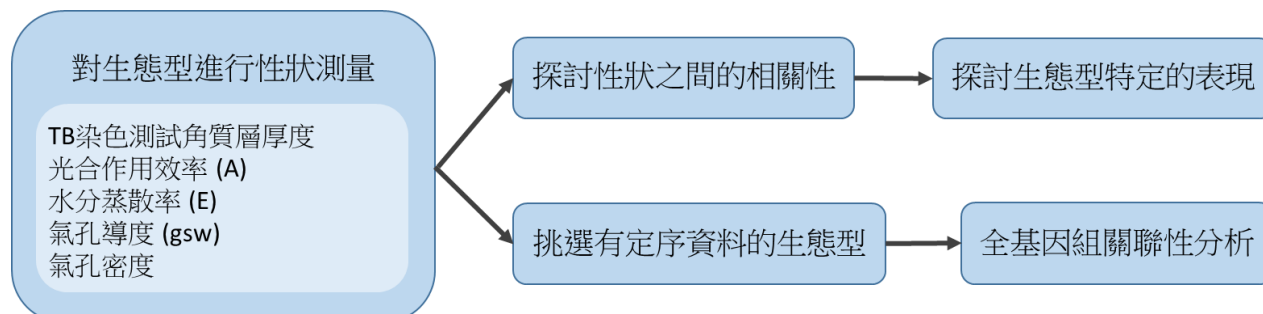
## （四）氣孔密度的測量

### 1.葉片固定液（1：7 醋酸酒精溶液）

### 2.KOH（1M）

## 參、研究過程與方法

一、針對不同來源的阿拉伯芥生態型之間，探討其角質層發育對於光合作用效率與氣孔表現的關係。



圖四、實驗流程圖(註:自行繪製)

### (一) 葉表皮角質層厚度測試

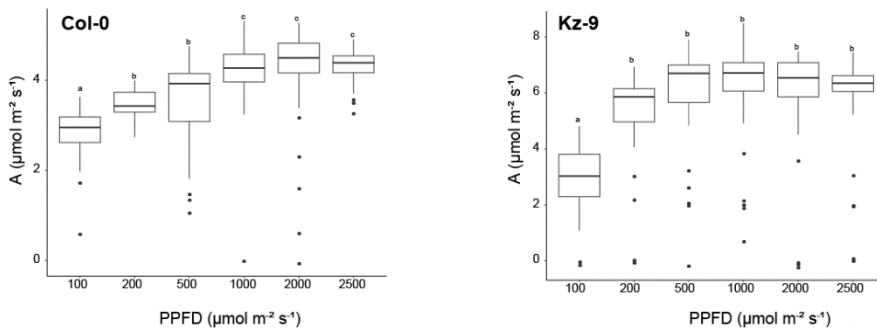
將待測生態型選取 3 株植物並分別採下第 5 片真葉，放入 6 mL 的離心管，並加入甲苯胺藍染劑 6 mL，浸泡 2 個小時後取出。染色完成的葉片取出拍照後浸泡於液態氮降溫並以研磨棒將其磨碎，置於 1.5 mL 的離心管中，加入 1 mL 80%的酒精，以 20000 r.p.m.離心 85 秒。抽取上清液 0.2 mL 加入 96 孔分析盤中後放入盤式分光光度計測量波長為 626 nm(針對染劑之波長)、430 nm (針對葉綠素的波長) 的吸光值。藉由兩數值的比值 ( $A_{626}/A_{430}$ ) 對角質層厚度進行比較估計(圖五)。其中比值高者相對於比值低者，染上更多的染劑，因此具有較薄的角質層，即具有較高的角質層通透性。

### (二) 光合作用效率 (A)、氣孔導度 (gsw) 和水分蒸散效率 (E) 的測量

將待測阿拉伯芥第 8 片真葉夾入 LI-6800 的葉室(圖五)，並將測量的溫度設為 28.0°C、二氧化碳濃度設為 400ppm、相對濕度設為 80%，針對前測實驗兩個角質層有差異的生態型 Col-0 和 Kz-9 測量其光反應，曲線在  $200\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  為上升測量點， $1000\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  為測量飽和點及  $2000\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  為超越測量飽和點，以三種光強度作為測量的條件(圖六)。



圖五、葉片夾入 LI-6800 (註:自行拍攝)



圖六、兩個角質層有差異的生態型 Col-0 和 Kz-9 所測量的光反應曲線 (註:自行繪製)

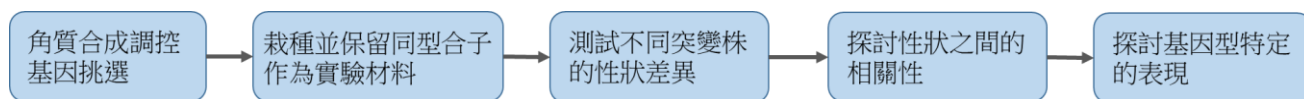
### (三) 氣孔密度測量

將葉片泡入 1M KOH 中，待葉片變得透明再以蒸餾水清洗葉片，製成玻片後置於顯微鏡下，以放大 40 倍觀察下表皮並計數視野下的氣孔數量，測得之數量除以視野實際面積  $0.11 \text{ mm}^2$  即為氣孔之密度。為避免重複計算，視野中超出上、左邊界之氣孔將不予計數，其餘皆予以計數。

### (四) 全基因體關聯性分析

從 Arabidopsis 1001 網頁取得生態型的基因型 VCF 檔案，經過格式轉換成為 PLINK，以 Genome-wide Efficient Mixed Model Association (GEMMA) 中的混合線性模型進行關聯性分析。分析結果以 R 套件 qqman 繪製曼哈頓圖，以  $\text{suggestiveline} = -\log_{10}(1e-05)$  和  $\text{genomewideline} = -\log_{10}(5e-08)$  作為閾值。

二、從角質層生合成路徑篩選調控基因，探討特定基因對角質層發育及光合作用效率和氣孔表現的功能。



圖七、實驗流程圖（註:自行繪製）

### （一）基因型鑑定分析（Genotyping）

將各基因型植物選取 10 株植物並採下其中一片葉子並放入離心管內，再分別加入 Edwards Solution (10X) 10  $\mu$ L、TAE buffer 90  $\mu$ L，以研磨棒研磨至看不見葉片，液體呈現綠色後，以 20000 r.p.m. 離心 90 秒後抽取上清液保存。在 8 排管中依序加入蒸餾水、2X MasterMix、3 種引子、DNA 樣本後放入聚合酶連鎖反應儀內設置進行 PCR。配置用於電泳跑膠(Gel electrophoresis)的瓊脂凝膠 (Agarose gel)，利用尺梳形成凹槽，加入 6  $\mu$ L 的 PCR 產物取並以 3  $\mu$ L 的分子量標準液 (DNA marker) 作為對照。添加完畢後，給予 120 V 電壓通電 20 分鐘，電泳完成後，將其置於電泳影像分析擷取系統中拍攝並分析結果。

表三、聚合酶連鎖反應儀條件設置

| 階段      | 1         | 2    | 3    | 4        | 5   |
|---------|-----------|------|------|----------|-----|
| 溫度 (°C) | 95        | 95   | 55   | 72       | 25  |
| 時間      | 30 m 30 s | 30 s | 30 s | 1 m 20 s | 5 m |

（階段 2~4 重複 30 循環）（註:自行繪製）

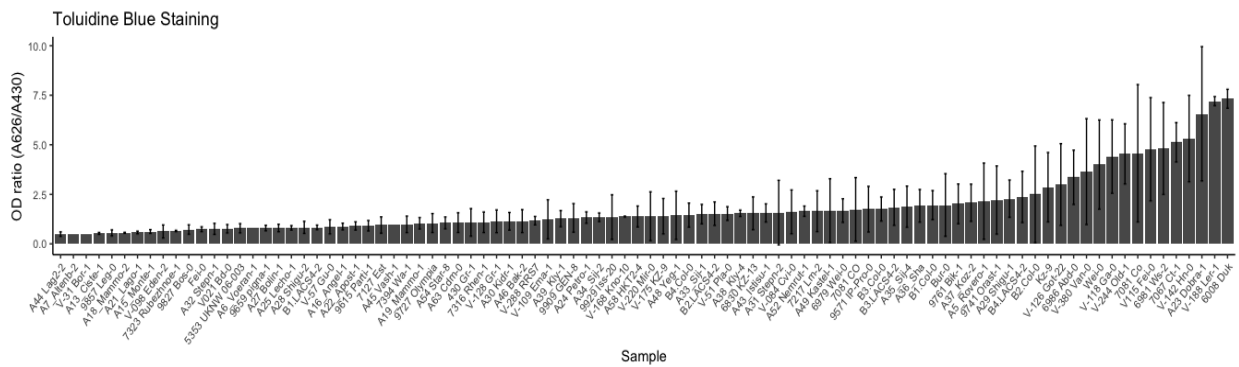
\*此部分的葉表皮角質層厚度測試、光合作用效率、水分蒸散效率和氣孔密度的測量方法，請參考第參章（研究過程與方法）的第一部分所述。

## 肆、研究結果

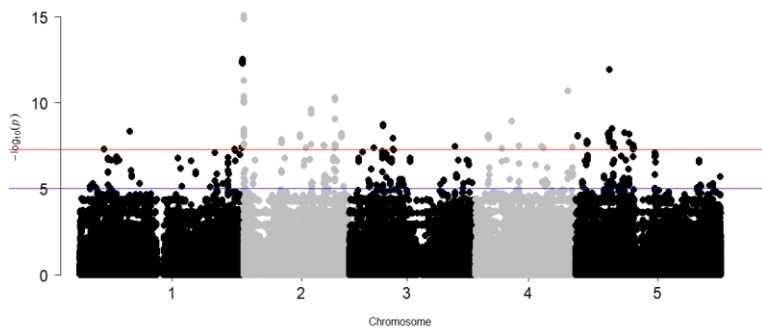
一、針對不同來源的阿拉伯芥生態型之間，探討其角質層發育對於光合作用效率與氣孔表現的關係。

### （一）葉表皮角質層厚度測試

角質層厚度測試的實驗結果如下圖八，於圖中愈靠右側之生態型具有較高之角質層通透性，即角質層愈薄。角質層厚度之全基因體關聯性分析結果中，位於第二條染色體的133691 至 151543 對鹼基對之間觀察到一群數值高於 8 的高相關性的基因點位（圖九）。



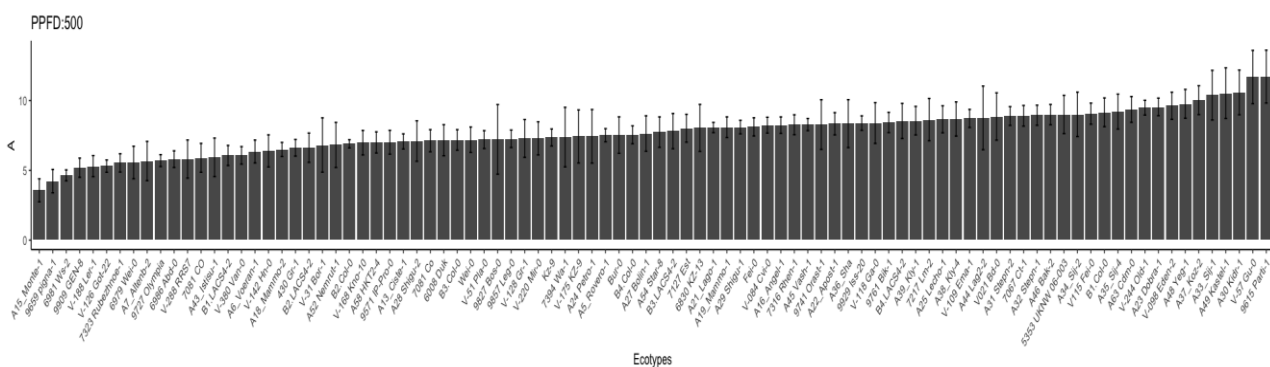
圖八、各生態型之角質層厚度測試實驗結果（註:自行繪製）



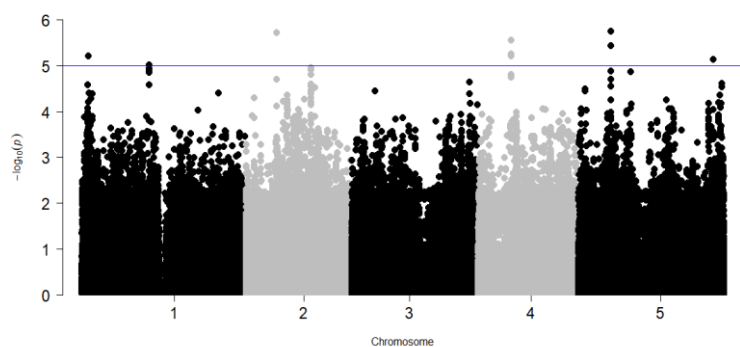
圖九、角質層厚度之全基因體關聯性分析結果（註:自行繪製）

## (二) 光合作用效率 (A)

選擇 LiCor 測得值在  $500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  下的結果。以二氧化碳同化率來探討光合作用效率的實驗結果如下圖十。光合作用效率與全基因體關聯性分析結果中，位於第五條染色體的第 5353284 至 6069417 對鹼基對之間觀察到一群數值高於 3 的高相關性基因點位（圖十一）。



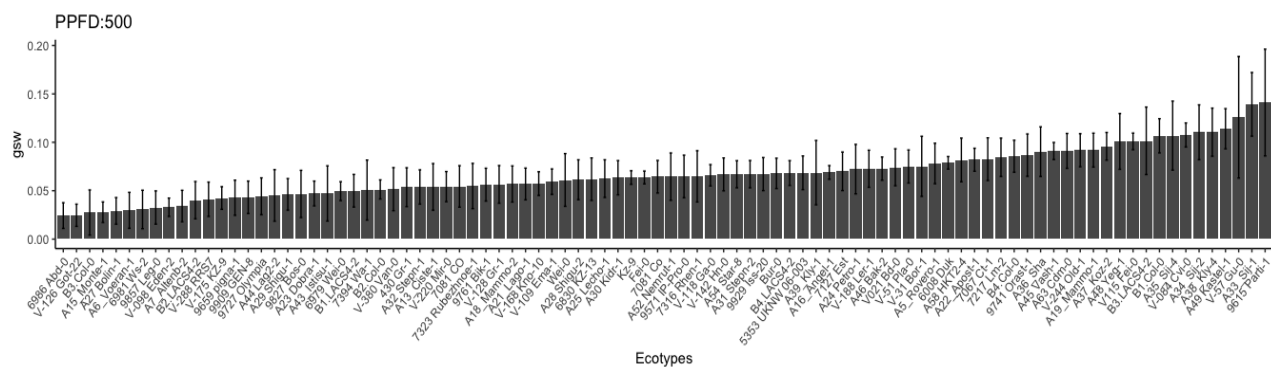
圖十、各生態型之二氧化碳吸收效率實驗結果（註:自行繪製）



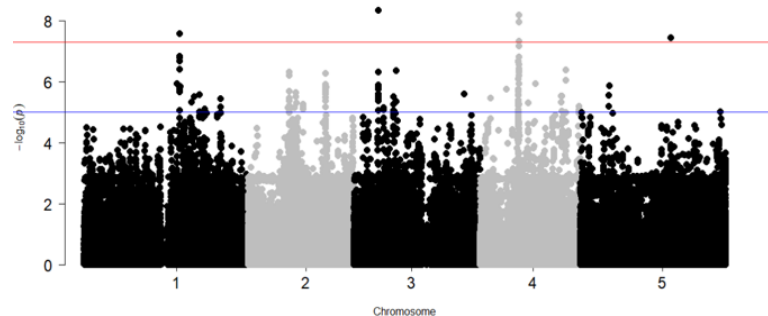
圖十一、二氧化碳吸收效率之全基因體關聯性分析（註:自行繪製）

### (三) 氣孔導度 (gsw)

氣孔導度的實驗結果如下圖十二。氣孔導度之全基因體關聯性分析結果中，有三群數值高於5的高相關性基因點位，分別位於第一條染色體的第17252695至17831727對鹼基對；位於第三對染色體的第4514533至4529188對鹼基對；位於第四對染色體的第7046076至7262906對鹼基對（圖十三）。



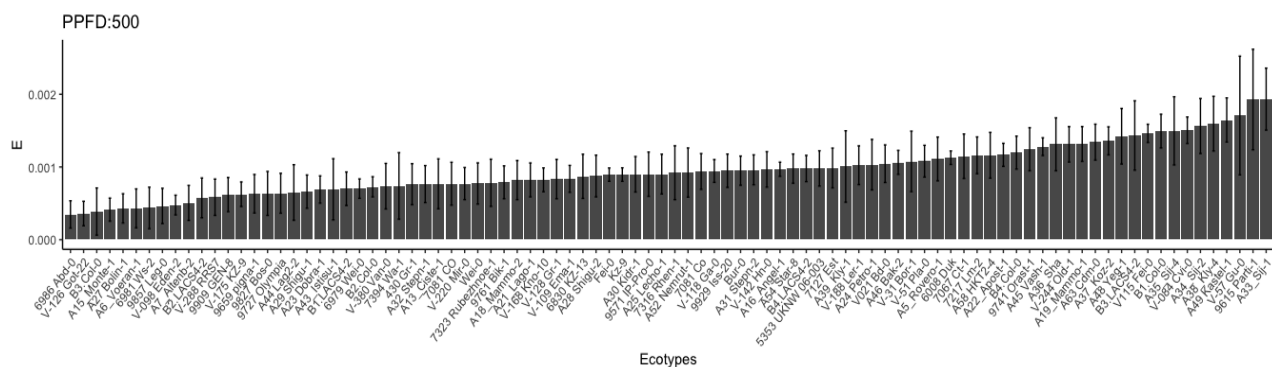
圖十二、各生態型之氣孔導度實驗結果（註:自行繪製）



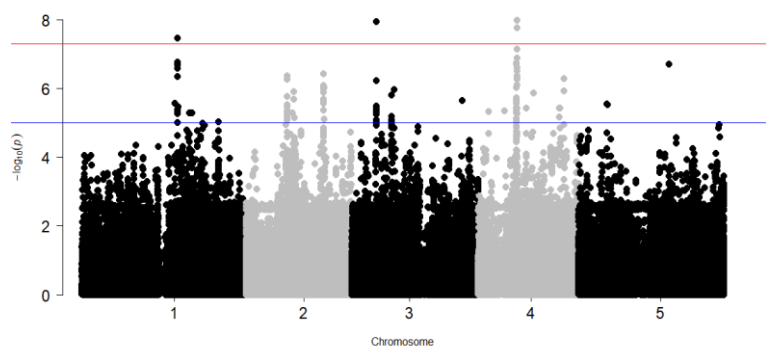
圖十三、氣孔導度之全基因體關聯性分析（註:自行繪製）

#### (四) 水分蒸散效率 (E)

水分蒸散效率的實驗結果如下圖十四。水分蒸散效率之全基因體關聯性分析結果中，由於水分蒸散效率與氣孔導度的測量原理高度相關，因此關聯性結果與氣孔導度所得的結果相同（圖十五）。



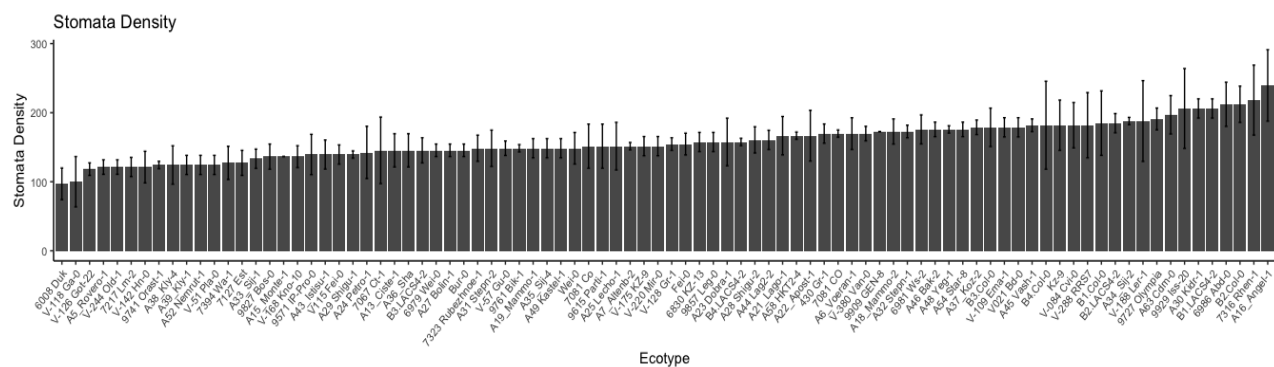
圖十四、各生態型之水分蒸散效率實驗結果（註:自行繪製）



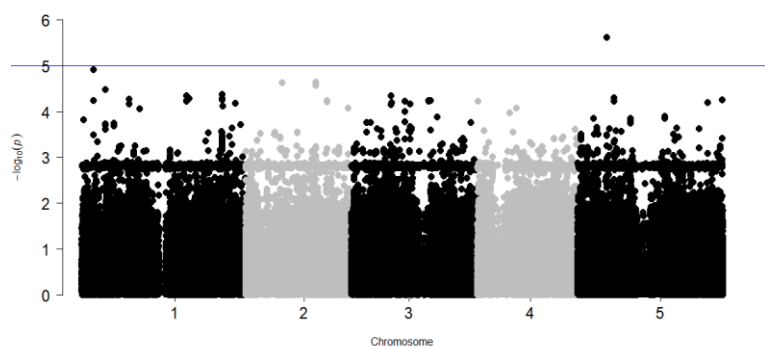
圖十五、水分蒸散效率之全基因體關聯性分析（註:自行繪製）

## （五）氣孔密度

氣孔密度的實驗結果如下圖十六。氣孔密度之全基因體關聯性分析結果中，各基因座與氣孔密度並無顯著關聯（圖十七）。



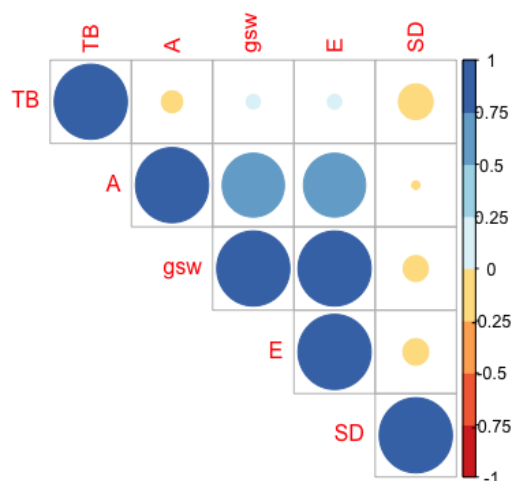
圖十六、各生態型之氣孔密度實驗結果（註:自行繪製）



圖十七、氣孔密度之全基因體關聯性分析（註:自行繪製）

## （六）氣孔密度

根據葉表皮進行甲苯胺藍染色的實驗結果，進行其與二氧化碳吸收效率、氣孔導度和水分蒸散效率的相關性分析，圓圈愈大檢定可信度愈大，數據的離散程度愈小，而藍色系代表數據間呈正相關，橙色系則代表呈負相關。由十八所示，角質層通透性(TB)與氣孔密度(SD)呈負相關，對水分蒸散效率(E)、氣孔導度(gsw)呈現低度正相關，對於二氧化碳吸收效率(A)則為低度負相關。



圖十八、阿拉伯芥生態型的角質層通透性（TB）與二氧化碳吸收效率（A）、氣孔導度（gsw）、氣孔密度（Sto）和水分蒸散效率（E）之間的相關性分析（註:自行繪製）

二、從角質層生合成路徑篩選調控基因，探討特定基因對角質層合成及光合作用效率和氣孔表現的功能。

表四為針對不同突變株進行 Genotyping 的實驗結果。除了 SALK\_062881C、SALK\_063767、SALK\_143503C 無同質結合的植株外，其他都能夠找到同質結合的植株。

表四、基因型鑑定分析實驗結果

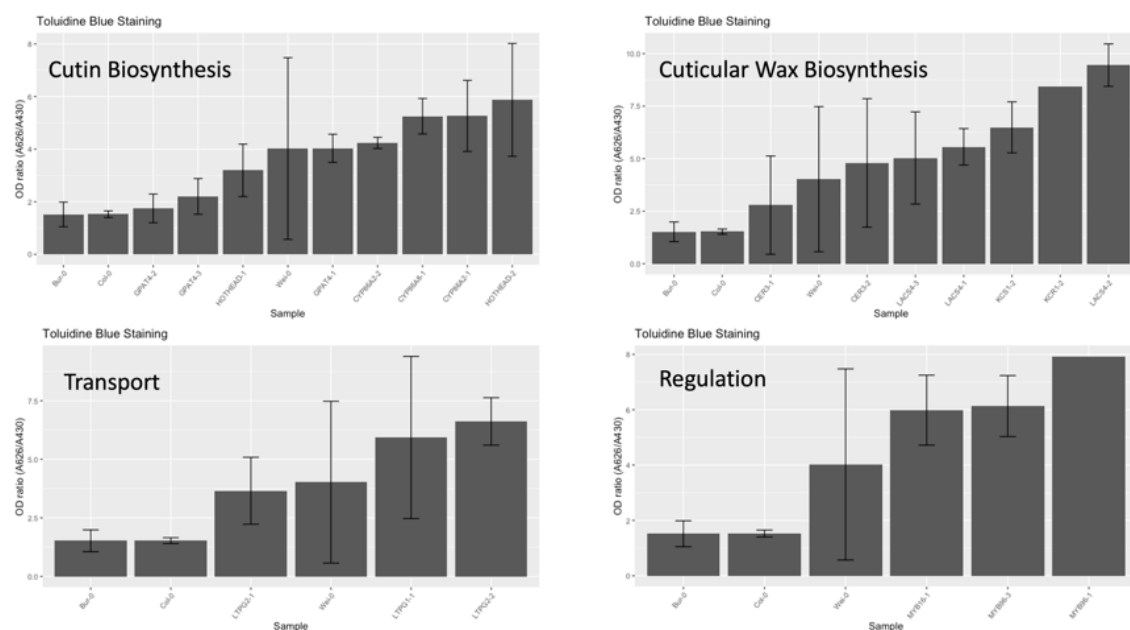
| 編號 | 基因名稱 | 突變株名稱                   | 角質生合成路徑功能 | 突變同質結合 | 異質結合 | 野生同質結合 | 合計 |
|----|------|-------------------------|-----------|--------|------|--------|----|
| 1  | CER3 | SAIL_832_E06 (CS877205) | 蠟質合成      | 2      | 7    | 4      | 13 |
| 2  | CER3 | SALK_020265             | 蠟質合成      | 1      | 0    | 13     | 14 |

|    |         |                                  |      |    |   |    |    |
|----|---------|----------------------------------|------|----|---|----|----|
| 3  | CER3    | CS33                             | 蠟質合成 |    |   |    |    |
| 4  | CYP86A2 | WiscDsLoxHs075_04A<br>(CS907129) | 角質合成 | 7  | 1 | 12 |    |
| 5  | CYP86A2 | SALK_005826C                     | 角質合成 | 16 | 0 | 5  | 21 |
| 6  | CYP86A2 | SALK_101120                      | 角質合成 |    |   |    | 0  |
| 7  | CYP86A8 | WiscDsLox387B09<br>(CS853921)    | 角質合成 | 2  |   | 8  | 10 |
| 8  | CYP86A8 | SALK_062881C                     | 角質合成 | 0  | 7 | 3  | 10 |
| 9  | GPAT4   | SAIL_189_D06<br>(CS808911)       | 角質合成 | 6  | 0 | 22 | 28 |
| 10 | GPAT4   | SALK_136889C                     | 角質合成 | 17 | 0 | 9  | 26 |
| 11 | GPAT4   | SALK_150886C                     | 角質合成 | 16 | 0 | 3  | 19 |
| 12 | HOTHEAD | SALK_019460                      | 角質合成 | 4  | 0 | 11 | 16 |
| 13 | HOTHEAD | SALK_024611                      | 角質合成 | 3  | 7 | 17 | 27 |
| 14 | HOTHEAD | CS24887                          | 角質合成 |    |   |    |    |
| 15 | KCR1    | SALK_063767                      | 蠟質合成 | 0  | 6 | 13 | 19 |
| 16 | KCR1    | SALK_074735                      | 蠟質合成 | 5  | 0 | 0  | 6  |
| 17 | KCR1    | SALK_143503C                     | 蠟質合成 | 0  | 1 | 1  | 2  |
| 18 | KCS1    | SALK_074123                      | 蠟質合成 |    |   |    |    |
| 19 | KCS1    | SALK_200839C                     | 蠟質合成 | 16 | 0 | 0  | 16 |
| 20 | LACS4   | SALK_101543C                     | 蠟質合成 | 19 | 0 | 0  | 19 |
| 21 | LACS4   | SALK_120357C                     | 蠟質合成 | 10 | 0 | 0  | 10 |
| 22 | LACS4   | SALK_140210                      | 蠟質合成 | 4  | 1 | 3  | 8  |
| 23 | LTPG1   | SAIL_1055_G03C<br>(CS867530)     | 運輸   | 13 | 0 | 0  |    |
| 24 | LTPG1   | CS68114                          | 運輸   |    |   |    |    |
| 25 | LTPG2   | SALK_009930C                     | 運輸   | 15 | 0 | 0  | 15 |
| 26 | LTPG2   | SALK_100010C                     | 運輸   | 14 | 0 | 0  | 14 |
| 27 | LTPG2   | CS71736                          | 運輸   |    |   |    |    |
| 28 | MYB96   | SAIL_815_G07<br>(CS879755)       | 調節   | 5  | 0 | 5  | 10 |
| 29 | MYB96   | SALK_111645                      | 調節   |    |   |    |    |
| 30 | MYB96   | SALK_128272                      | 調節   | 1  | 0 | 8  | 9  |
| 31 | MYB16   | WiscDsLox507D08<br>(CSCS859329)  | 調節   | 9  | 1 | 10 | 20 |

(註:自行製作)

## （一）葉表皮厚度測試

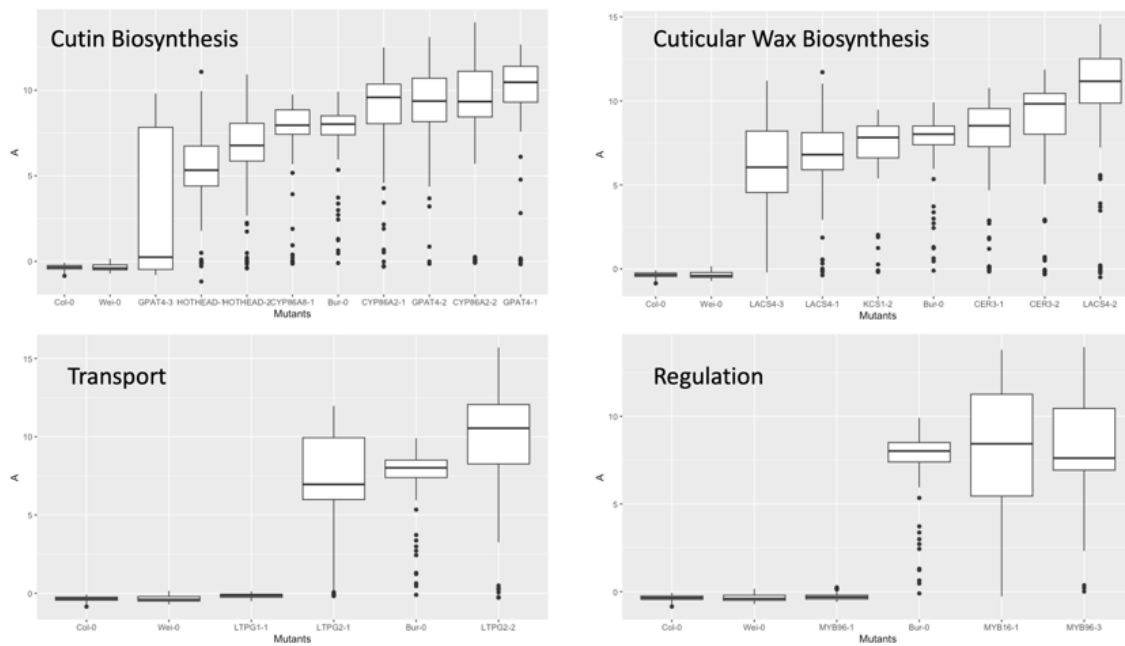
參考 Kong 等人(2020) 的基因功能歸類，分成角質生合成、蠟質生合成、運輸與調控功能四組（表四）。葉表皮角質層經甲苯胺藍染色再測量吸光值比值的結果如圖十九。其中以蠟質生合成有關的 LACS4-2、KCR1-2 和調控功能有關的 MYB96-1 突變株具有較高的比值，說明這些突變株的角質層較薄，而角質生合成有關的 GPAT4-2 和 GPAT4-3 與蠟質生合成有關的 CER3-1 有較低的比值，說明此群突變株的角質層較厚。



圖十九、各基因型葉片經甲苯胺藍染色後測得的吸光值比值結果（註:自行繪製）

## （二）光合作用效率 (A)

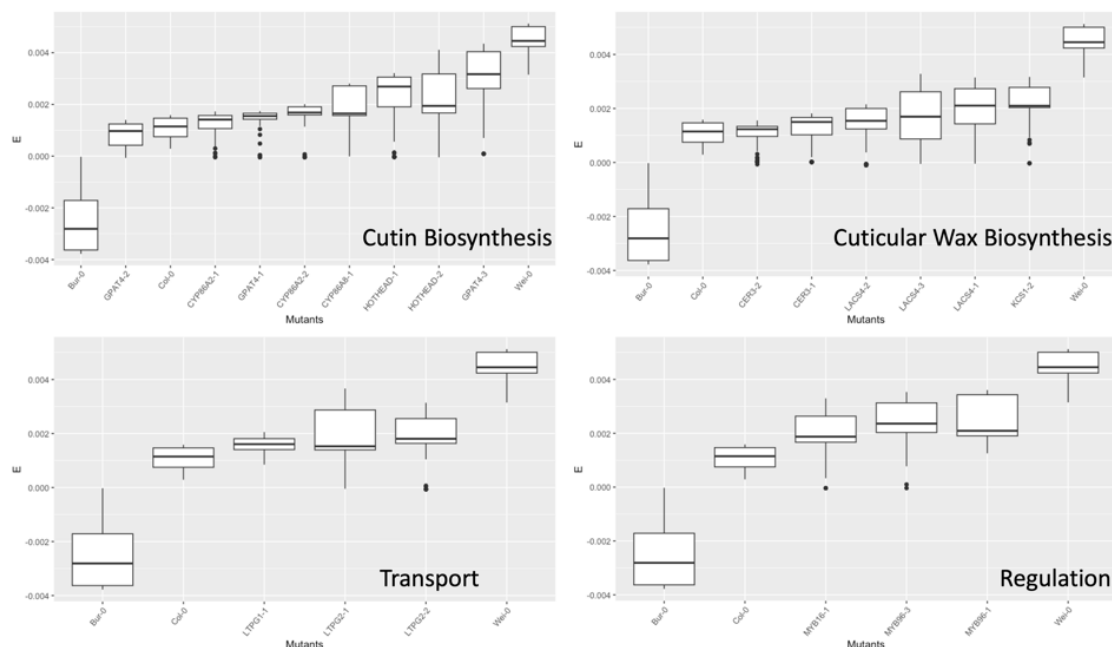
選擇 LiCor 測得值在  $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  下的結果。光合作用效率 (A) 在不同基因型的表現數據如下圖二十。在光合作用效率結果中，蠟質生合成有關的 LACS4-2、運輸有關的 LTPG2-2 和角質生合成有關的 GPAT4-1 擁有較高的二氧化碳同化率，而調控有關的 MYB96-1、運輸有關的 LTPG1-1 和角質生合成有關的 GPAT4-3 的讀值較低。



圖二十、各生態型光合作用效率（A）實驗結果（單位： $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ）（註:自行繪製）

### (三) 水分蒸散效率 (E)

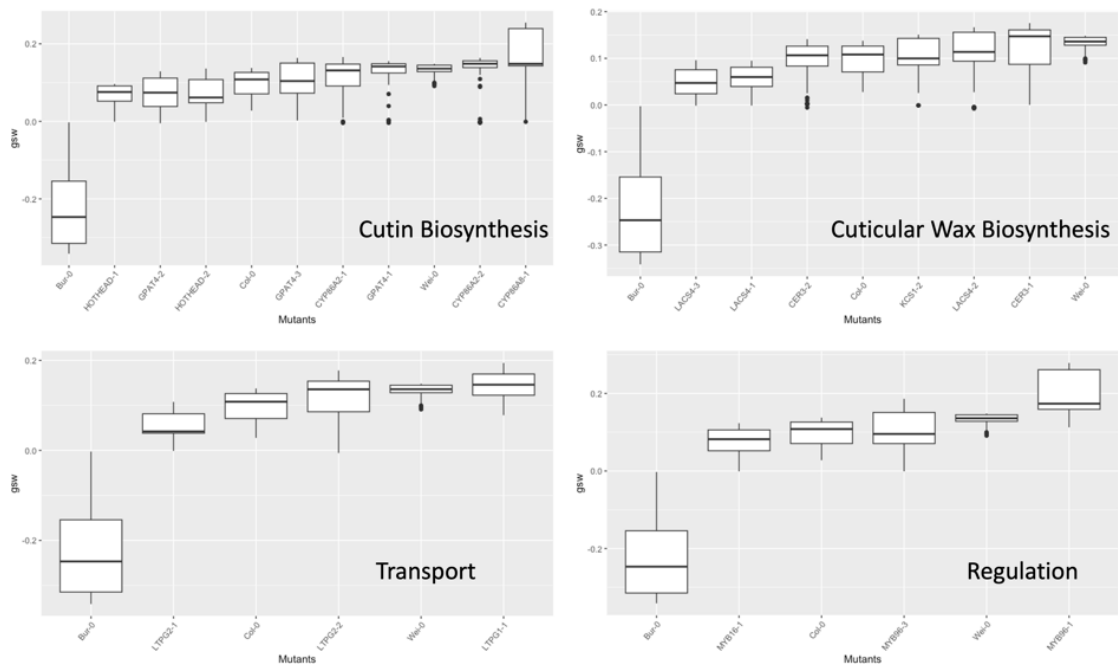
水分蒸散效率(E)在不同基因型的表現數據如下圖二十一。結果顯示，角質生成有關的 GPAT4-3 和調控有關的 MYB96-1 及 MYB96-3 有較高的蒸散效率，角質生合成有關的 GPAT4-2 和 CYP86A2-1、與蠟質生合成有關的 CER3-2 具有較低的數值。



圖二十一、各生態型水分蒸散效率 (E) 實驗結果 (單位： $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) (註:自行繪製)

### (四) 氣孔導度 (gsw)

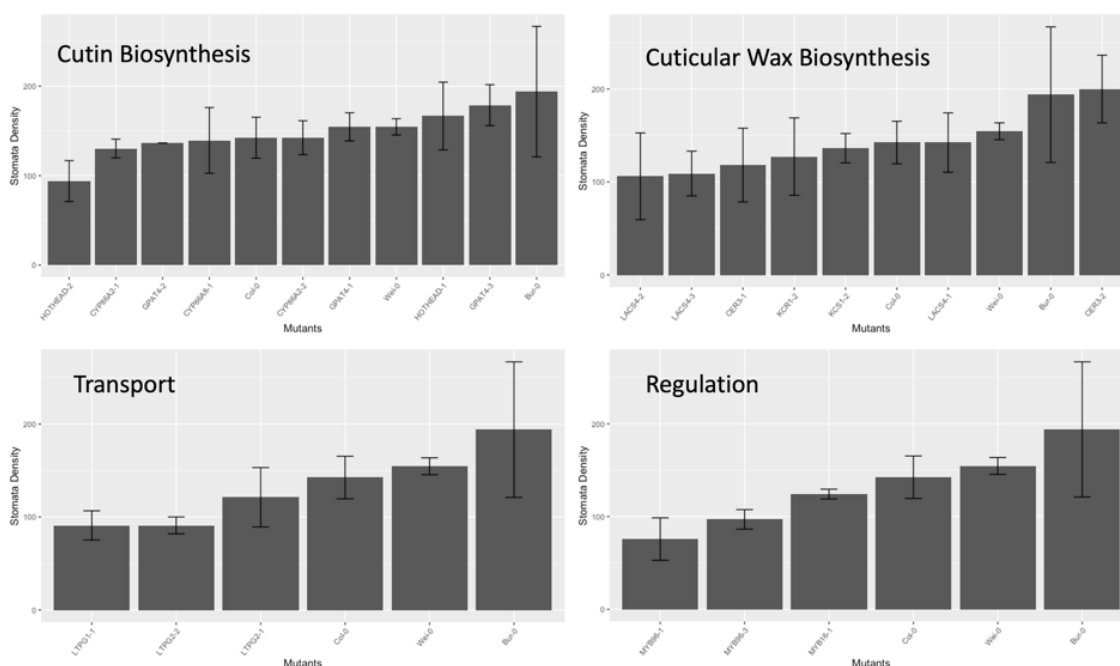
氣孔導度（*gsw*）在不同基因型的表現數據如下圖二十二。結果顯示，調控有關的 MYB96-1、角質生合成有關的 CYP86A8-1 及運輸有關的 LTPG1-1 有較高的氣孔導度，而其中以蠟質生合成有關的 LACS4-1 和 LACS4-3、運輸有關的 LTPG2-1 有較低的氣孔導度。



圖二十二、各生態型氣孔導度（*gsw*）實驗結果（單位： $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ）（註:自行繪製）

### （五）氣孔密度測量

各基因型子葉在顯微鏡下經計數後的氣孔密度如圖二十三所示，與角質生合成有關的 CER3-2 和角質生合成有關的 GPAT4-3 和 HOTH160D-1 有較高的氣孔密度，而調控有關的 MYB96-1 和運輸有關的 LTPG1-1、LTPG2-2 有較低的氣孔密度。



圖二十三、各基因型子葉氣孔密度（單位：個  $\mu\text{m}^{-2}$ ）（註：自行繪製）

## 伍、討論

一、針對不同來源的阿拉伯芥生態型之間，探討其角質層發育對於光合作用效率與氣孔表現的關係。

- （一） 當角質層通透性提升（角質層變薄）時，氣孔的密度下降，而氣孔導度及水分蒸散率將提升。此外，結果顯示角質層通透性增加到一定程度時，二氧化碳的固定效率會逐漸達到飽和。
- （二） 從各性狀之全基因體關聯性分析結果可以得知，觀測具有顯著且相鄰的部分，角質層厚度有關的基因座，位於第二條染色體上；在二氧化碳吸收效率的部分，關聯性較高的基因點位座落在第五條染色體上。從氣孔導度和水分吸收效率的全基因體關聯性分析結果可知，二性狀的調控基因可能於第一、三、四條染色體上。未來可以更改分析模型的參數，判斷各分析結果中維持穩定的顯著關係的位點為較可靠的，進而探討含註解的基因。氣孔密度的關聯性，推測各性狀可能是經由特定幾段基因所調控，因此效應較低難以偵測顯著關聯，亦考慮增加樣本數來提升檢測效力。

二、從角質層生合成路徑篩選調控基因，探討特定基因對角質層合成及光合作用效率和氣孔表現的功能。

- (一) 透過分析突變株性狀調查結果，觀察到調控有關的 **MYB96-1** 的突變株有較薄的角質層、較低的光合作用效率、較高的蒸散率和氣孔導度及較低的氣孔密度。另一方面，與角質生合成有關的 **GPAT4-3** 有較薄的角質層和較高的氣孔密度，說明控制角質層或氣孔其中一個性狀的基因被抑制時，會促進另外一個性狀的表現，後續可進一步探討自然族群的生態型中角質層生合成路徑的調控基因的功能。

## 陸、結論

- 一、本研究透過對來自不同來源的生態型阿拉伯芥進行全基因體關聯性分析（**GWAS**），已針對角質層和氣孔形成的不同性狀找到可能的調控基因的位置，將進一步使用候選基因的点突變樣本進行實驗，以證實所找到的調控基因與角質層和氣孔形成的關係。
- 二、在研究參與角質層合成途徑的基因時，突變株表現出比野生型更強的角質層通透性，代表其角質層結構受到了損害，未來將進一步進行氣孔和光合作用表現型觀察，以了解氣孔發育與角質層形成之間的相互作用。

## 柒、參考資料與其他

1. ABRC. <https://abrc.osu.edu/> (accessed 23 October 2023).
2. The Arabidopsis Information Resource,TAIR.<https://www.arabidopsis.org/index.jsp>
3. Batsale, M., D. Bahammou, L. Fouillen, S. Mongrand, J. Joubès, et al. 2021. Biosynthesis and Functions of Very-Long-Chain Fatty Acids in the Responses of Plants to Abiotic and Biotic Stresses. *Cells* 10(6): 1284.
4. Fich, E.A., N.A. Segerson, and J.K.C. Rose. 2016. The Plant Polyester Cutin: Biosynthesis, Structure, and Biological Roles. *Annual Review of Plant Biology* 67(1): 207–233.
5. Jenks, M.A., H.A. Tuttle, S.D. Eigenbrode, and K.A. Feldmann. 1995. Leaf Epicuticular Waxes of the Eceriferum Mutants in Arabidopsis. *Plant Physiology* 108(1): 369–377.
6. Kong, L., Y. Liu, P. Zhi, X. Wang, B. Xu, et al. 2020. Origins and Evolution of Cuticle Biosynthetic Machinery in Land Plants. *Plant Physiology* 184(4): 1998–2010.
7. Krolkowski, K.A., J.L. Victor, T.N. Wagler, S.J. Lolle, and R.E. Pruitt. 2003. Isolation and characterization of the Arabidopsis organ fusion gene HOTHEAD. *The Plant Journal* 35(4): 501–511.
8. Kurdyukov, S., A. Faust, S. Trenkamp, S. Bär, R. Franke, et al. 2006. Genetic and biochemical evidence for involvement of HOTHEAD in the biosynthesis of long-chain alpha-,omega-dicarboxylic fatty acids and formation of extracellular matrix. *Planta* 224(2): 315–329.
9. Monda, K., A. Mabuchi, S. Takahashi, J. Negi, R. Tohmori, et al. 2020. Increased Cuticle Permeability Caused by a New Allele of ACETYL-COA CARBOXYLASE1 Enhances CO<sub>2</sub> Uptake. *Plant Physiology* 184(4): 1917–1926.
10. Yang, S.-L., N. Tran, M.-Y. Tsai, and C.-M.K. Ho. 2022. Misregulation of MYB16 expression causes stomatal cluster formation by disrupting polarity during asymmetric cell divisions. *Plant Cell* 34(1): 455–476.

## 【評語】 060010

1. 本研究在利用全基因組關聯分析(GWAS)探討阿拉伯芥中候選基因對角質層與氣孔發育的調控之影響。結果顯示，與角質層厚度相關的基因位於第二條染色體，與二氧化碳吸收效率相關的基因位於第五條染色體，而氣孔導度和水分吸收效率的調控基因可能在第一、三、四條染色體上。此外，透過反向遺傳學進一步篩選候選基因。
2. 雖然做了 GWAS，最後並沒有選出來做進一步分析的基因。
3. 本研究實驗方法合理，但結論則仍須更進一步的實驗證明。