

2025年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號	060011
參展科別	植物學
作品名稱	麩醯胺酸誘導阿拉伯芥的受體表現

就讀學校	臺北市立建國高級中學
指導教師	謝明勳 劉翠華
作者姓名	張展睿

關鍵詞	<u>Glutamine、Plant Defence、Receptor</u>
-----	---

作者簡介



學海無涯，繁如天上的星辰，有太多我看不到、碰不到、想不到，做研究就像在茫茫星海裏垂釣，一點點調整、學習，在些許運氣的祝福中，拉上條未知的魚，喜悅油然而生。

在小學時，我夢想做個農夫，想以雙手培育生養人民的作物，數年，延伸到對植物本身的興趣，讓糧食更好的栽也是種農作吧，植物的生命令我著迷，雖然路走的艱辛，卻很歡喜。

附件三

研究報告封面

2025 年臺灣國際科學展覽會

研究報告

區別：植物學科

科別：植物學科

作品名稱：麩醯胺酸誘導阿拉伯芥的受體表現

關鍵詞：Glutamine、Plant Defence、Receptor

（最多三個）

編號：

（編號由國立臺灣科學教育館統一填列）

摘要

自然界中，植物以 NO_3^- 和 NH_4^+ 作為主要氮源，在吸收後轉化為麩胺酸(Glu)和麩醯胺酸(Gln)作為第一產物進行基本生理反應，在我們實驗室先前的研究中，發現 Gln 會誘導阿拉伯芥側根生長、壓力反應和抗病性，所以提出了一種假說「細胞外的 Gln 是營養氮源，也是一種“危險訊號”」，藉由可能存在的 Gln 的受體表現。目前我進行了其中三組受體的測試，分別是 wall-associated kinase2(WAK2)、wall-associated kinase3(WAK3)和 EF-Tu 受體(EFR)，WAK 家族是穩定細胞壁果膠的受體激酶，然而我們實驗中發現 WAK3 在 wak3 mutant 的表現是不穩定的。EFR 為接收 EF-Tu(elongation factor thermal unstable)的模式辨識受體(PRR)，參與活化植物防禦及 PAMP-triggered immunity (PTI)，efr mutant 在 Gln 的誘導下表現了防禦相關基因與水楊酸生成之相關基因。本研究將有助於深入理解 Gln 在植物防禦和側根生長中的功能及其調控機制，並為未來的作物改良和病害防治提供理論基礎。

abstract

In nature, plants primarily utilize NO_3^- and NH_4^+ as nitrogen sources. After absorption, these compounds are converted into glutamate (Glu) and glutamine (Gln), which serve as the initial products for essential physiological processes. Our previous research has shown that Gln can induce lateral root growth, stress responses, and disease resistance in *Arabidopsis*. This led us to propose the hypothesis that "extracellular Gln acts as both a nutritional nitrogen source and a 'danger signal'," potentially through the expression of Gln receptors.

Currently, I am investigating three receptor candidates: wall-associated kinase 2 (WAK2), wall-associated kinase 3 (WAK3), and the EF-Tu receptor (EFR). The WAK family, including WAK2 and WAK3, functions as receptor kinases that stabilize cell wall pectin. However, our experiments revealed that the expression of wak3 in wak3 mutant line is unstable. Conversely, EFR, a pattern recognition receptor (PRR) that recognizes elongation factor thermal unstable (EF-Tu), plays a role in activating plant defense mechanisms and PAMP-triggered immunity (PTI). Under Gln induction, efr mutant showed increased expression of defense-related genes and genes associated with salicylic acid synthesis.

This research will enhance our understanding of the roles of Gln in plant defense and lateral root growth, as well as its regulatory mechanisms, providing a theoretical basis for future crop improvement and disease management.

壹、 前言

環境中，植物以 NO_3^- 和 NH_4^+ 作為主要氮源(Owen and Jonse 2001)，在吸收後先轉化為 NH_4^+ ，和植物體內代謝後新生的 NH_4^+ 透過麩醯胺酸合成酶 (GS2) 和麩胺酸合成酶行使 GS/GOGAT 途徑合成麩胺酸(Glu)和麩醯胺酸(Gln) (Lea and Miflin 1974 ; Coruzzi 2003)，作為無機碳同化成有機碳的第一產物，所有植物體內的含氮化合物皆來源於 Glu 和 Gln (Liao 等人，2022 ; Lee 等人，2023)，在我們實驗室先前的研究中，發現 Gln 會誘導阿拉伯芥側根生長、壓力反應和抗病性，因為比起 Glu 已經有很多受體和訊息傳導的研究，Gln 在植物的訊息傳導還未有研究釐清，因此我們假設有可能存在的 Gln 受體，傳遞訊息參與阿拉伯芥的側根形成和防禦反應。

在過去的研究中，已透過 RNA-seq 來尋找可能的 Gln 受體，並篩選出 6 個 candidate receptor，我在其中選擇了 wak2、wak3 和 efr-1 突變株來進行分析，其中 Wall-associated kinase(WAK) family 為跨膜的受體激酶，包含絲胺酸 Ser/蘇胺酸 Thr 激酶結構域和一段具有兩個表皮生長因子 (epidermal growth factor, EGF) 重複序列的胞外結構域(Zheng-Hui He 1999)，推測 Gln 可能影響植物細胞壁的重塑並與生長素共同調控側根生長，且 WAK 參與其中。而 EF-Tu 受體(EFR)則是一種接收病原體相關分子模式(PAMP)的模式辨識受體(PRR) (Zipfel, 2006)，而接收後的訊息傳導會

觸發 PAMP-triggered immunity (PTI) · 造成 MAPK 和水楊酸生成途徑等

防禦訪應活化(Lal rt al, 2018)

貳、 研究目的

- 一、探討 WAK3、WAK2 受 Gln 誘導的側根生長調控
- 二、探討 EFR 受 Gln 誘導的防禦路徑

參、 研究材料與研究器材

一、生物材料

- 1. 阿拉伯芥(*Arabidopsis thaliana*)

二、藥品溶液

- 1. 麩醯胺酸(Glutamine)
- 2. 麩胺酸(Glutamate)
- 3. 硝酸銨(NH_4NO_3)
- 4. 酒精(EtOH)
- 5. 瓊脂(Agar)
- 6. 瓊脂膠(Agarose)

7. Murashige & Skoog 缺氮培養基(MS (-N))
8. MES 緩衝劑(MES buffer)
9. 氫氧化鉀水溶液(Potassium hydroxide solution)
10. 鹽酸水溶液 (HCl)
11. 漂白水(bleach)
12. 聚山梨醇酯二十乳化劑(tween-20)
13. 滅菌水(Autoclaved water—ddH₂O)
14. 乙二胺四乙酸 (EDTA)
15. 十二烷基硫酸鈉 (SDS)
16. 寡核苷酸(oligonucleotides)
17. 2X 1kb Platinum Direct PCR Universal Master Mix
18. TURBO DNA-free™ Kit
19. Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR
20. 異丙醇(isopropanol)
21. 檸檬酸鈉(Sodium citrate)
22. 氯化鈉(NaCl)
23. qPCR—SYBR Green universal master mix (Applied biosystems)

三、研究設備

1. 電子秤

2. pH 計
3. 離心機
4. 乾燥箱
5. 滅菌釜
6. 層流操作台
7. 盤式光譜分析儀
8. 真空幫浦
9. 加熱攪拌器
10. 直立式解剖顯微鏡
11. 相機
12. 生長箱
13. 冰箱(4 度、-18 度、-80 度)

四、軟體

1. Excel(數據分析)
2. QuantStudio® Design & Analysis Software

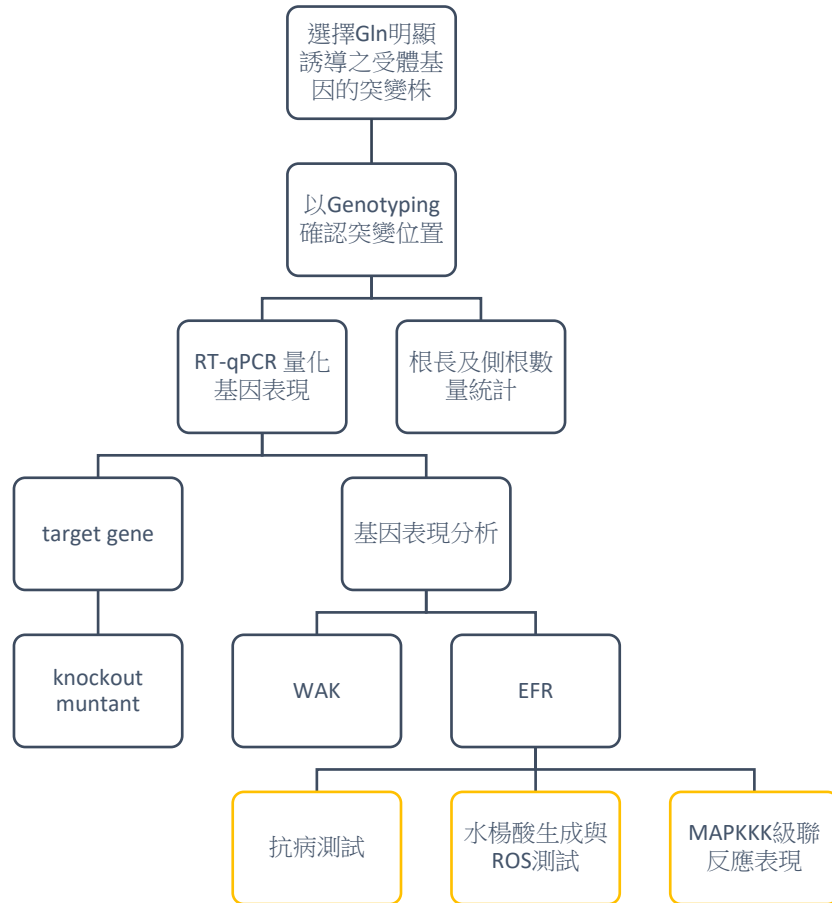
五、實驗器材

1. 500 ml、1000 ml、2000 ml 燒杯
2. 100 ml、1000 ml 量筒
3. 10 μ l、20 μ l、200 μ l、1 ml pit、pipetman

4. 100 ml、200 ml、250 ml、500 ml、1000 ml 血清瓶
5. 15 ml、50 ml tube
6. 封口膜
7. 384 孔盤、8 連排
8. 直徑 9 cm 圓盤
9. 10*10cm 方盤
10. 注射型過濾器
11. 擦手紙 tissue
12. 拭鏡紙
13. 打火機、酒精燈
14. 鋁箔紙
15. 保鮮膜
16. 手套 (乳膠、塑膠)

肆、研究過程與方法

一、研究架構圖



黃框表示實驗進行中

圖一、研究流程圖

二、研究方法

(一) 植株材料與生長條件

1. 野生型：使用阿拉伯芥 (*A. thaliana*) Col-0 生態型作為野生型 (WT)。
2. 使用的株系：從阿拉伯芥生物資源中心 (ABRC) 獲得的株系包括:wak2、wak3、efr-1、efr-2 由賴爾泯實驗室友情贊助。

3. 種子消毒：將種子用含有 0.05% (v/v) Tween-20 的漂白水消毒。
4. 培養基配製：在培養皿中放入 1/2 Murashige and Skoog (MS) modified N-free basal salt mixture (M531, PhytoTechnology Laboratories, Lenexa, Kansas, USA) ，並添加 0.5%蔗糖、0.05% (w/v) 2-(N-morpholine)-ethanesulfonic acid (MES)、0.8%瓊脂，還有所需濃度的 NH_4NO_3 、Gln 或其他氨基酸，並用 1 M KOH 調整 pH 至 5.7。
5. 培養條件：將培養皿封閉在 parafilm 中，放置於 4°C 培養 2 天，然後轉移到生長室，使用 16 小時光照/8 小時黑暗的循環，溫度設定為 22°C。

(二) 突變株篩選

1. 流程

- (1) 配制 1/2 MS medium (pH5.7) :1/2MS 2.19g, sucrose 10g, MES 0.55g, agar 8g—共 1L，以 KOH 調整 pH 值
- (2) 洗種子
 - a. 倒約 500 顆種子
 - b. 加入 1 ml 漂白水及 0.05%的 tween-20 離心 30 秒
 - c. 倒出液體，並加入 1 ml ddH₂O 離心 30 秒，重複 9 次
 - d. 最後再加入 1 ml ddH₂O

(3) 點種子

- a. 取圓盤，每盤在圓盤頂端 1/4 處點 10 到 15 顆轉種子
- b. 用封口膜將圓盤繞 2 圈封住
- c. 放入冰箱 1 天行春化作用
- d. 將圓盤直立放入生長室 7 天

(4) 取發芽阿拉伯芥轉移到土壤生長 2 周

(5) 剪葉片加入 dilution buffer 20 μ l 於 8 連排中搗碎

(6) 配置跑 PCR 的溶液，每 10 μ l 有: 2x taq master mix 5 μ l、
ddH₂O 2.5 μ l、primer F 0.5 μ l、primer R 0.5 μ l、tissue(步
驟 5 的樣本) 1.5 μ l，加入 96 孔盤中

(7) Run PCR(50 min)

(8) 配膠(1% agarose 膠)

- a. Agarose 0.6 g 加入 TAE 60 ml
- b. 微波爐加熱搖晃使 agarose 完全溶解
- c. 加入 0.001% EeBr

(9) 取步驟 7 樣本 5 μ l 點於膠盤，180V 跑膠 30 分鐘

(10) 電泳後以 UV 光拍攝對照可知基因型，留下同型合子
(homozygous) 進行後續實驗

(四) 基因表現分析(q-PCR)

1. RNA 萃取

- (1) 採收 12 天阿拉伯芥樣本 6 株，裝入 1.5 ml 的離心管中，加入滅菌過的鉻珠，放入液態氮冷凍脆化，用組織粉碎機打碎
- (2) 使用 cell lysis solution 300 μ l 溶解樣本，混和離心後靜置 5min
- (3) 加入 protein-DNA precipitation solution 100 μ l，4 度靜置 10min 後低溫離心 10min
- (4) 將 s/n(步驟二產物)轉移到新的 SMT(離心管)，加入異丙醇 (isopropanol) 300 μ l離心 4min，用 70%EtOH 清洗後風乾
- (5) 加入 DEPC water 25 μ l，使用 Nanodrop 進行 RNA 濃度測定，並保存於-80°C冰箱

2. 反轉錄 (RT, reverse transcription)

- (1) 混合 RNA 1000ng、50uM oligo dT 1 μ l、10mM dNTP 1 μ l
- (2) 放入 PCR machine 65°C 5 分鐘，4 度至少 2 分鐘
- (3) Reaction buffer (5 X) 4 μ l、dTT 2 μ l、SSTIII 1 μ l，以 PCR machine 37°C 60 分鐘、72°C min、4°C保存，進行反轉錄反應
- (4) 反轉錄後的 cDNA 進行 10 倍稀釋(20cDNA，180 水)，並

放入-20°C保存

3. RT-PCR

(1) 購買我們預測會有影響之基因的 primer

(2) 混合 5 μ l SYBR Green、1.25 μ l cDNA、2.75 μ l ddH₂O 並

加入 primer 各 0.5 μ l

(3) 以反轉錄同步定量偵測系統進行 RT-qPCR，分析 $\Delta\Delta CT$ 。PCR

模式(約 1 小時 30 分鐘)

(五) 側根生長分析

1. 流程

(1) 培養:配制 0、5、10、20M NN Gln Glu medium

(pH5.7):1/2MS 2.19g, sucrose 10g, MES 0.55g, agar 8g,

NN Gln Glu(0、5、10、20 mM),water—共 1L，以 KOH

調整 pH 值

(2) 洗種子

a. 倒約 500 顆種子

b. 加入 1 ml 漂白水及 0.05%的 tween-20 離心 30 秒

c. 倒出液體，並加入 1 ml 滅菌水離心 30 秒，重複 9 次

d. 最後再加入 1 ml ddH₂O

(3) 點種子

a. 每種條件拿出 5 方盤，每盤在方盤頂端 1/4 處點 6-10

顆 WAK2、WAK3 轉殖株種子和 6-10 顆 WT 種子

b. 用封口膜將方盤繞 2 圈

c. 放入冰箱 1 天行春化作用

d. 將方盤直立放入生長室 7 天

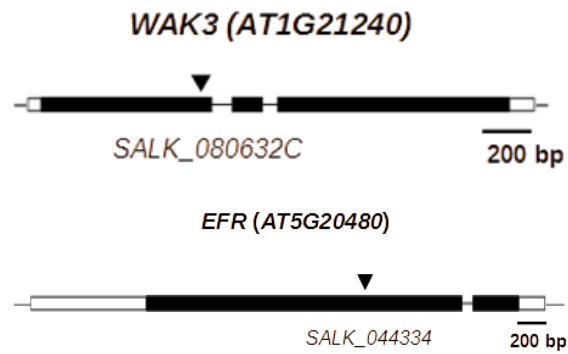
(4) 拍照

a.於黑布上照相紀錄，匯至電腦計算根毛數量

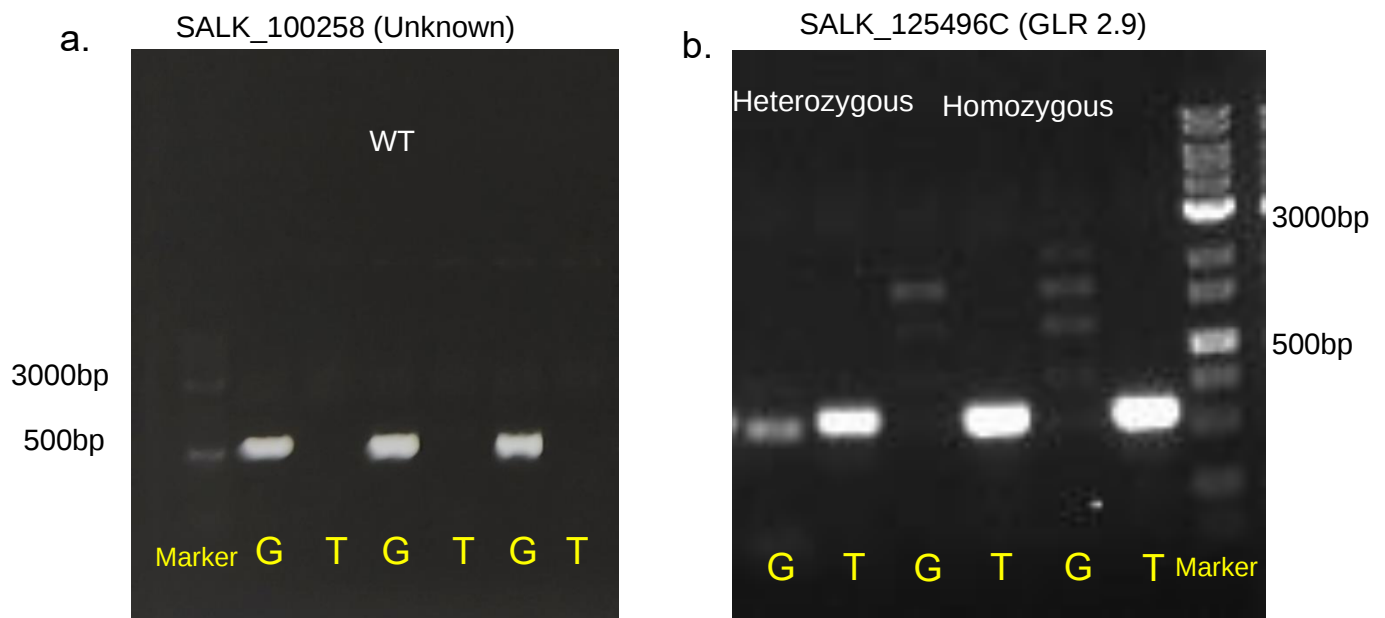
伍、實驗結果

一、篩選突變株

從使用 RNA-seq 得到的候選受體基因中，我挑選了 WAK2、WAK3 和 EFR 進行研究，在 ABRC 網站上購買 T-DNA 插入之突變株。為區分突變的狀況分離出同型合子突變株，故我們將買來的突變種子生長一個月後，進行基因型鑑定分析(Genotyping)。在 T-DNA Primer Design 網站取得 Primer 設計，每個樣本分兩組(WT, T-DNA)進行 DNA 電泳，膠圖中若以 WT 設計的 primer 沒有 band，而有插入序列的 primer 有 band，即可判斷其為 homozygous 突變株。結果如圖三(以曾經製作的 mutant 為例)所示。我們以篩選結果為 homozygous 的突變株，進行後續實驗。



圖二、WAK3 and EFR Primer 設計圖，途中箭頭所指即為 T-DNA 插入點位(作者繪製)



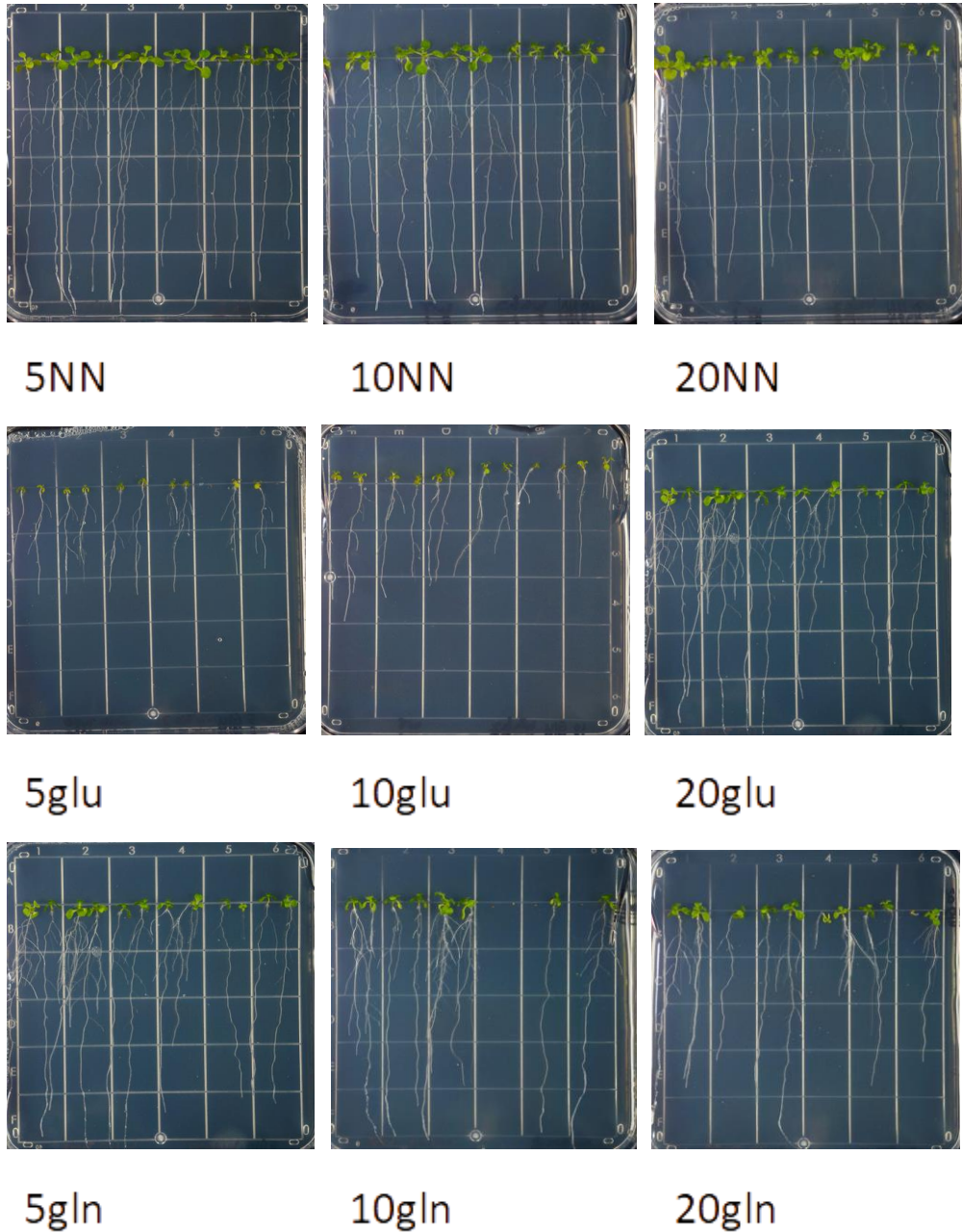
圖三、Genotyping 的膠圖結果，G 加入正常 Gene 設計的 Primer，T 則是加入設計在 T-DNA 上的 Primer，Marker=2X 1kb Platinum Direct PCR Universal Master Mix，圖中標出 3000bp、500bp 位置，並標示 WT, Heterozygous, Homozygous 結果的判斷範例(作者拍照並繪製)

二、側根數量統計

1. 方法

由實驗室過去的研究，已知 Gln 會誘導側根發育，所以我藉由濃度的調整觀察 mutant 和 WT 側根生長的表現，記錄側根的數量，量化 Gln 誘導的影響。本實驗配置 5、10、20 mM NH_4NO_3 、Gln、Glu 的培養基以中線分隔，其中硝酸銨作為對照組代表植物在一般環境下的首選氮源，Gln 為實驗組，Glu 則用於排除 Gln 產生的現象並非源自於 Gln/Glu 的轉換。左邊種植 WT 作為對照組，右邊種植 mutant 作為實驗組，點種子於方盤栽培 12 天，用相機拍攝後記錄側根的數量並測量根長，由於 EFR 為植物防禦相關受體，並未參與側根生長，所以本實驗只進行 WAK mutant 的測量。

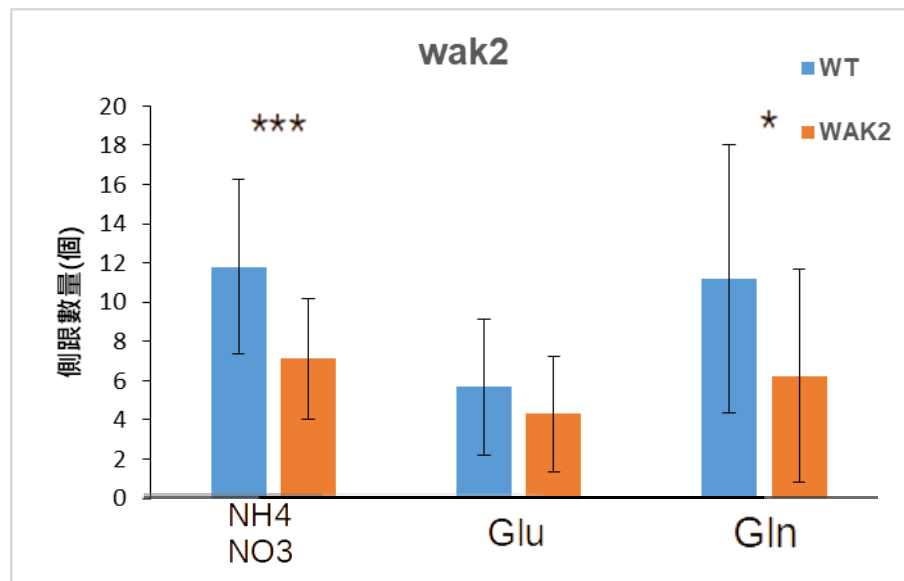
2. WAK2



圖四、12 天培養的 wak2 阿拉伯芥幼苗拍攝圖，盤子左右半邊為 WT, wak2 mutant，NN= NH_4NO_3 , gln=glutamine, glu=glutamate(作者拍攝)

經過 12 天的培養後，我將整盤方盤拍照紀錄，圖四為從中挑選的範

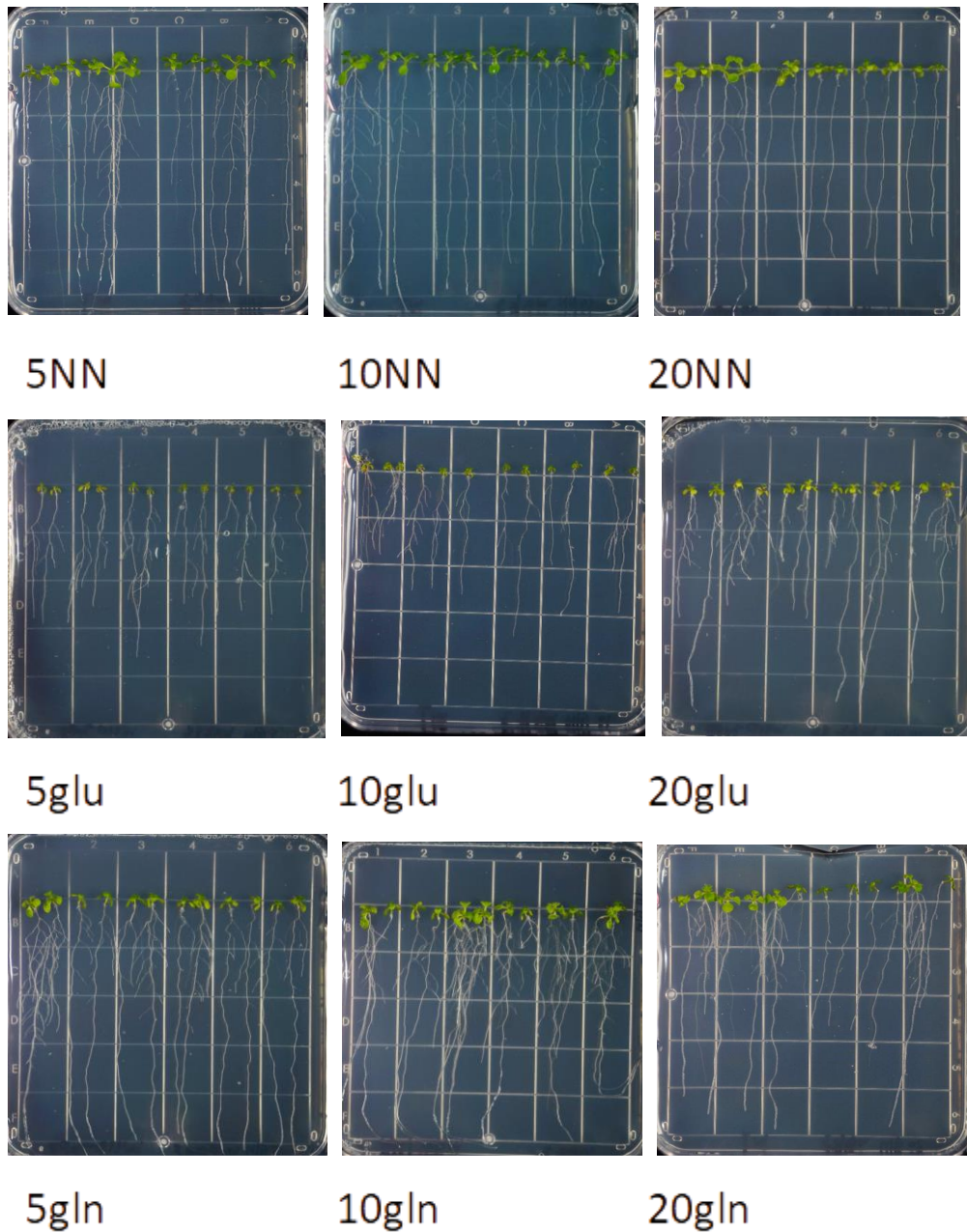
本，由 5NN、10NN、20NN 的圖可知，在硝酸銨環境培養的 WT 與 Mutant 並無顯著差異，而從 5glu、10glu、20glu 的圖可知而在 Glu 環境下，WT 的根長及側根數量與 Glu 的濃度呈現正相關，但 mutant 並未表現相關性，這點從 5gln、10gln、20gln 的圖可知在 Gln 環境下亦有發生，且有部分種子晚發芽或未發芽，Gln 環境下的 WT 也沒有表現出一致性，因此選擇進行第二次種植，並先將濃度變因排除，固定培養基濃度為 5mM 進行觀察，依照相同培養流程，於 12 天拍照觀察後計算側根平均數量，結果如圖五所示。



圖五、WAK2 的側根數量統計，以 T.TEST 比較 WT 與 wak2 進行統計檢定，沒有*表示數據沒有顯著差異 ($P > 0.05$)，*代表 $0.05 < P < 0.01$ ，**代表 $0.01 < P < 0.001$ ，***代表 $P < 0.001$ (由作者進行實驗並繪製圖表)

由圖五可見 Gln 下的 WT 和 wak2 mutant 有顯著差異，可由於標準差較大，且種子發芽率較差，我懷疑種子篩選時有部分混雜，故重新繁殖 wak2 突變株，目前還未有新的數據。

3. WAK3



圖六、12 天培養的 wak3 阿拉伯芥幼苗拍攝圖，盤子左右半邊為 WT,

wak3 mutant · NN= NH_4NO_3 , gln=glutamine, glu=glutamate

同 wak2 的操作流程，在 12 天拍照紀錄。(由作者進行實驗並繪製圖表)

由圖五的 5NN、10NN、20NN 的圖可見硝酸銨環境 WT 和 wak3

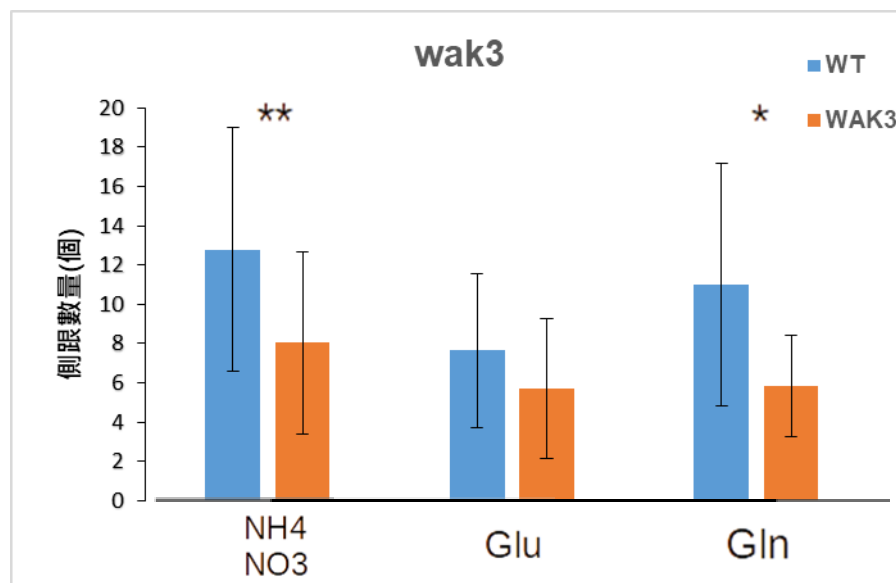
mutant 並無明顯差異性，而從 5glu、10glu、20glu、5gln、

10gln、20gln 圖可知，在 Glu、Gln 環境下，WT 和 mutant 的差異

並未與濃度有明顯正相關，且相同環境下亦有不一致性出現，故重新取

種子操作，控制濃度為 5mM，重複相同培養流程進行第二次實驗，種

植於生長室 12 天後拍照計算側根平均數量得圖七。



圖七、WAK3 的側根數量統計，以 T.TEST 比較 WT 與 wak2 進行統計

檢定，沒有*表示數據沒有顯著差異 ($P > 0.05$)，*代表 $0.05 < P$

< 0.01 ，**代表 $0.01 < P < 0.001$ ，***代表 $P < 0.001$ (由作者進行實驗並

繪製圖表)

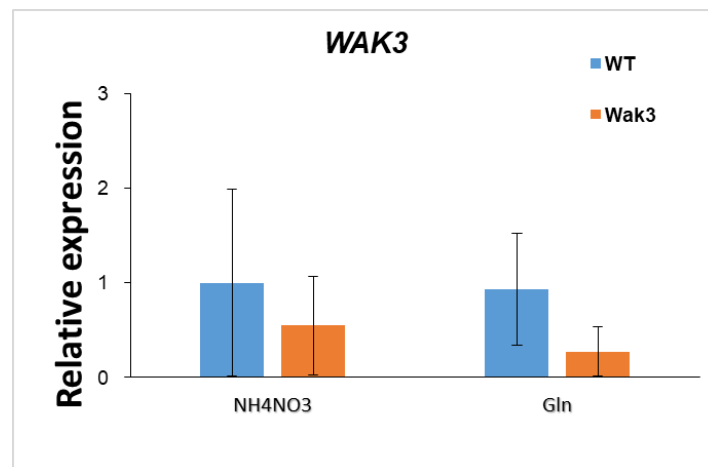
由表二可見 Gln 下的 WT 和 wak3 mutant 有顯著差異，這顯示 WAK3 可能與側根發育有關，可是比較硝酸銨和 Gln 環境的 WT 側根數量卻沒有明顯差異，這可能是因為標準差過大，由於地震導致部分 Gln 方盤受汙染使得其數據較少，但從 Glu 境的 WT 和 mutant 的比較無明顯相關，說明 WAK3 的表現與 Glu 無關。

三、基因表現分析

2. 方法

在我們實驗室過去的研究中，以 RNA-seq 技術分析 Gln 誘導的基因表現，而為了觀察 mutant 的基因表現在 Gln 環境的差異，我經由 RT-qPCR 檢測目標基因的 CT 值(Cycle Threshold)，分析基因表現量。我使用 12 天白天光週期的阿拉伯芥幼苗進行實驗，以異丙醇萃取 total RNA，使用 TURBO DNA-free Kit 做 DNase 處理，並以 Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR 與 oligo(dT)將 RNA 合成為 cDNA，使用 Power SYBR Green PCR master mix 以 RT-qPCR 測定轉錄產物的濃度，並在 StepOnePlus Real-Time PCR Systems 上進行，所有 RT-qPCR 的數據均做三重複，並以 *ACTIN2* 作為實驗對照組。

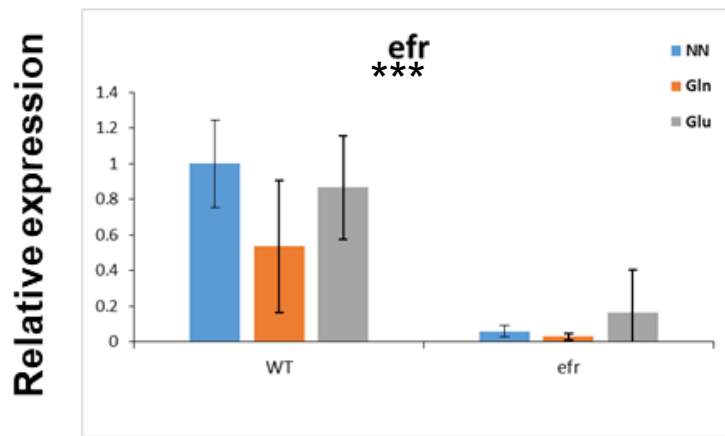
3. WAK3



圖八、WAK3 target gene 表現的 q-PCR 數據，以 T.TEST 比較 WT 與 wak2 進行統計檢定，沒有*表示數據沒有顯著差異 ($P > 0.05$)，*代表 $0.05 < P < 0.01$ ，**代表 $0.01 < P < 0.001$ ，***代表 $P < 0.001$ (由作者進行實驗並繪製圖表)

由圖八可知，target gene 在 mutant 有表現，所以 WAK3 並非 knockout mutant，本次關於 WAK3 的 RT-qPCR 數據不具有可信度。

4. EFR



圖九、efr-1 target gene 表現的 q-PCR 數據，以 T.TEST 比較 WT 與 ef

進行統計檢定，沒有*表示數據沒有顯著差異 ($P > 0.05$)，*代表

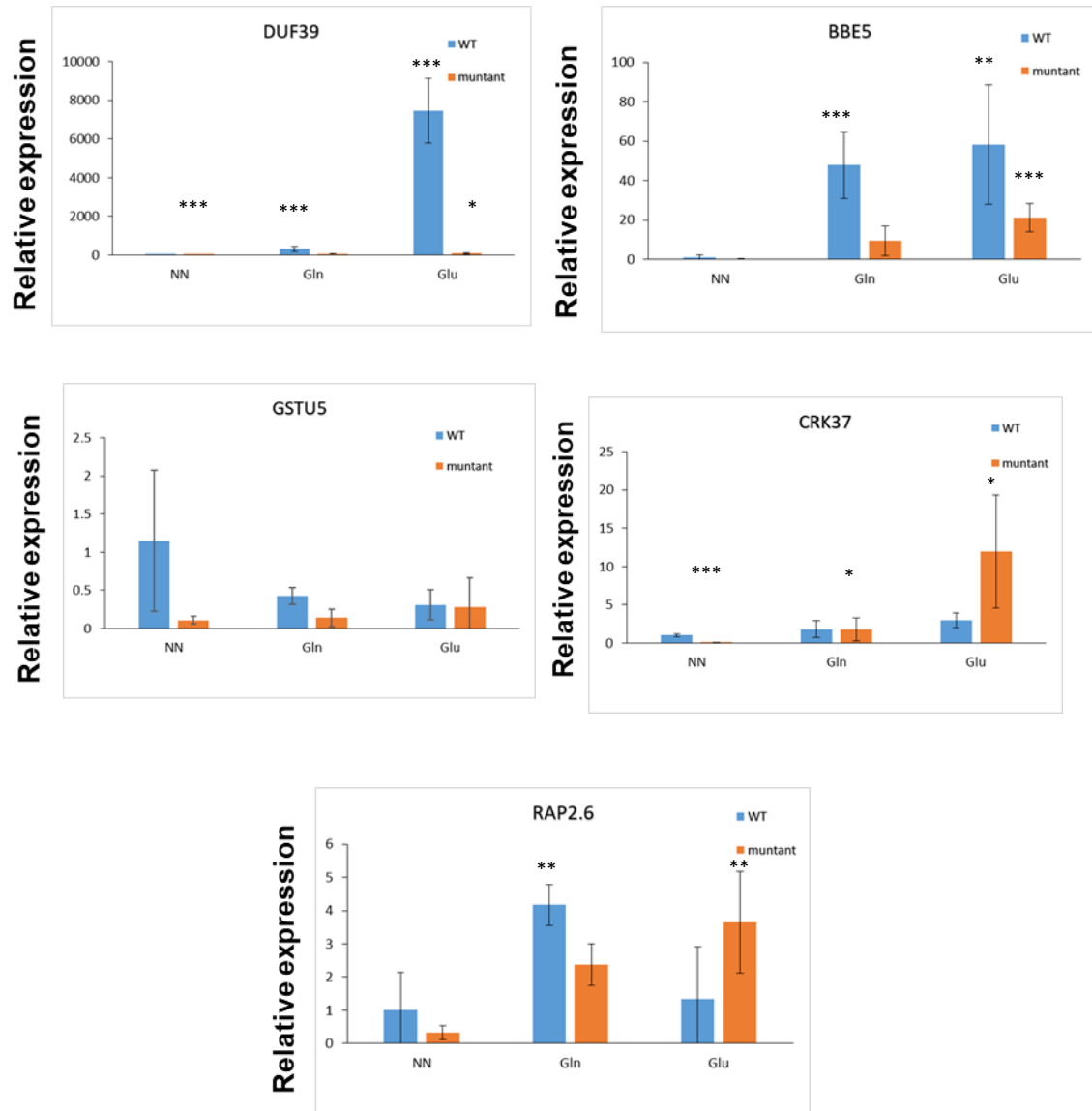
$0.05 < P < 0.01$ ，**代表 $0.01 < P < 0.001$ ，***代表 $P < 0.001$,

NN= NH_4NO_3 , gln=glutamine, glu=glutamate (由作者進行實驗並繪

製圖表)

(1) 由圖九可知，efr-1 mutant 為 knockout mutant，說明 T-DNA 的

插入處符合預期。



圖十、efr-1 Gln responsive 相關基因表現的 q-PCR 數據，以 T.TEST

比較 WT 與 ef 進行統計檢定，沒有*表示數據沒有顯著差異 (P

>0.05)，*代表 0.05 < P < 0.01，**代表 0.01 < P < 0.001，***代表

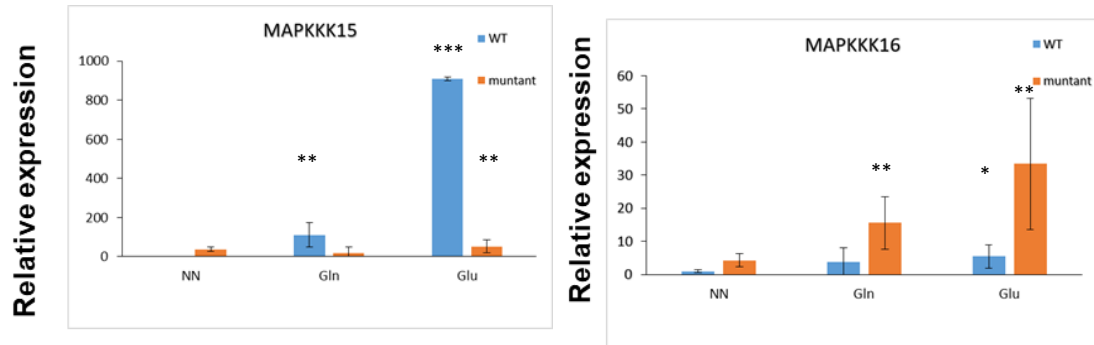
P < 0.001, NN = NH₄NO₃, gln = glutamine, glu = glutamate (由作者進

行實驗並繪製圖表)

(2) 由圖十可知，DUF39 的 Gln 相較 NH₄NO₃ 約有 10 倍的基因表現，且 mutant 並無明顯差距，說明 DUF39 受 Gln 誘導的表現與 EFR 有相關，而 Glu 的數據也符合前人研究，表現量相較 WT 大幅提升。

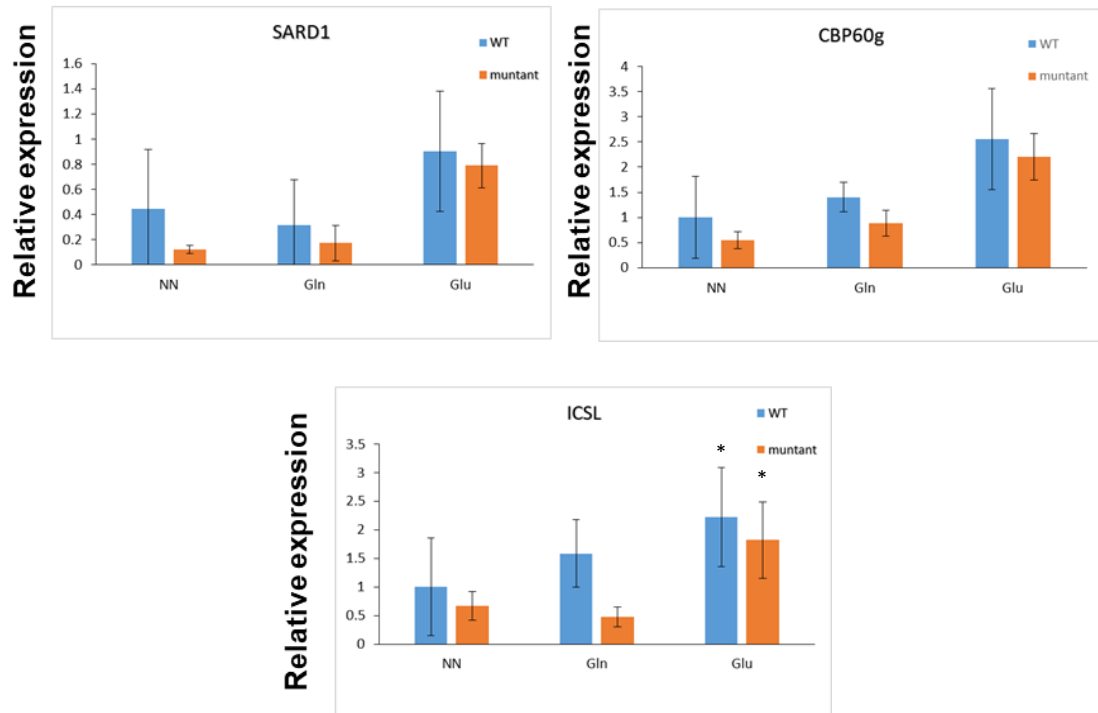
BBE5(Berberine bridge enzyme 5)基因的表現也呈現，在 Gln 下的大量表現，且相對 mutant 之表現量與 NH₄NO₃ 相差較少，說明 BBE5 受 Gln 誘導的表現與 EFR 有相關。而 GSTU5 基因的表達由於 NH₄NO₃ 環境的 WT 標準差過高，難以比對與 Gln 與 WT 的差異，但從 Gln 環境下 WT 和 mutant 的對比仍顯示其表達可能與 EFR 有關。

CRK37 的表現在 Gln 環境下與 WT 和 mutant 的差異沒有明顯相關性，說明其可能與 EFR 的誘導較無相關。RAP2.6 為 transcription factor，由圖可見 RAP2.6 在 WT 的表現於 Gln 下與 NH₄NO₃ 對比顯卓提升，但在 efr-1 的 Gln 環境表現雖相較 WT 較低，卻與 NH₄NO₃ 下的 efr-1 仍有不少的提升，這與轉錄因子的特性有關，說明 EFR 可能參與 RAP2.6 的調控路徑，但並非必要的。



圖十一、*efr-1* signal transduction 相關基因表現的 q-PCR 數據，以 T.TEST 比較 WT 與 *ef* 進行統計檢定，沒有*表示數據沒有顯著差異 ($P > 0.05$)，*代表 $0.05 < P < 0.01$ ，**代表 $0.01 < P < 0.001$ ，***代表 $P < 0.001$, NN= NH_4NO_3 , gln=glutamine, glu=glutamate (由作者進行實驗並繪製圖表)

(3) 由圖十一可知，MAPKKK15 的表現在 Gln 下與 NH_4NO_3 有顯著差異，且 mutant 的相較無明顯差異，這說明 MAPKKK15 受 Gln 誘導的表現與 EFR 有相關，又可以看到 MAPKKK16 的表現在 mutant 相較 WT 高，這可能說明 EFR 在 Gln 誘導下的表現於 MAPKKK 相異部份的調控可能並不相同。



圖十二、*efr-1* SA Defence 相關基因表現的 q-PCR 數據，以 T.TEST 比較 WT 與 *ef* 進行統計檢定，沒有*表示數據沒有顯著差異 ($P > 0.05$)，*代表 $0.05 < P < 0.01$ ，**代表 $0.01 < P < 0.001$ ，***代表 $P < 0.001$ ，NN= NH_4NO_3 , gln=glutamine, glu=glutamate (由作者進行實驗並繪製圖表)

(4) 由圖十二可知，三個基因的趨勢類似，皆顯示 mutant 相較 WT 較低的基因表達，這說明 EFR 和水楊酸活化途徑有關，這與前人的研究相符，但 Gln 的誘導卻並不明顯，推測這可能與壓力環境有關，水楊酸途

徑已知會誘導植物的防禦反應，推測於通常環境中，SA defence 的基因表現維持一定平衡，在壓力應激後才會呈現 Gln 誘導的差異性。

陸、 討論

一、探討 WAK3、WAK2 受 Gln 誘導的側根生長調控

在三次重複的阿拉伯芥 wak2、wak3 mutant 的培養中，側根生長的性向表現了大量的不一致性，於相同培養環境的同來源植株也有不同的表現，分析實驗操作的穩定性，我在本項實驗中污染率低於 1%，且種子來源植株皆經歷 42 天繁殖與 Genotyping 的測試，操作熟練度為數據不穩定的原因機率較低，目前推測可能有兩項原因造成數據的變異性：

1. WAK2 種子與 WT 的混淆:由於分裝種子時的標示不全，且從實驗結果的表現顯示有部分 wak2 mutant 的表現與 WT 接近，這可能是數據標準差較大的原因。
2. mutant 在 Gln 的環境下不易發芽或發芽較晚:由於本研究與植物生長相關，且實際測試 mutant 的發芽率相對 WT 較低，這可能導致量化計算時 Gln 環境下的 mutant 資料較少，拉大數據的標準差。

又因為 WAK3 的 RT-qPCR 的數據出現了 mutant 的 target gene 表達的異常現象，目前本實驗室對 WAK 的興趣較少。

二、探討 EFR 受 Gln 誘導的防禦路徑

在本實驗室過去的研究使用 RNA-seq 測定 Gln 誘導的基因表現，EFR 在定序中的顯示其受 Gln 誘導 2 倍，而在我使用 RT-qPCR 測試的實驗中，*efr-1* mutant 在關於 Gln responsive、signal transduction、SA defence 的基因表現都有被 Gln 提高的現象，且從數據分析的過程中，發現了一些有趣的方面，EFR 作為阿拉伯芥有名的受體，已有許多研究針對其反應流程進行分析，而在阿拉伯芥 Gln 處理的運作機轉上，較少有實驗室關注，故我對這其中的反應產生了興趣，目前分析 q-PCR 的數據，顯示 Gln 對 *efr-1* 的誘導與已知的 EFR 訊號傳遞有大量重疊，為其 Gln 受體的假說提供了一個證據，目前同步種植 *efr-2* mutant，不同位置 T-DNA 插入的 mutant 將有助於證明 Gln 誘導 EFR 的基因表現之真實性。

柒、 結論

WAK3 可能參與側根生成的調控，但與 Gln 的誘導並無明顯關聯，而 EFR 受 Gln 誘導表現了防禦相關基因與水楊酸生成之相關基因，為其乃 Gln 受體的假說提供了一個證據。

捌、 未來展望

當前研究進行到 EFR (EF-Tu receptor) q-PCR 分析，由於數據的標準差偏大，未來預計會重複實驗以確認其可重複性，而往後的研究將降聚焦在阿拉伯芥 EFR 在 Gln 誘導下影響的調控路徑，並同時在 *efr-2 mutant* 上鑑定，以確保實驗變量單純源自於 EFR。根據 q-PCR 數據顯示，在 Gln 培養的環境下，阿拉伯芥的水楊酸生成和調控路徑、MAPK 級聯免疫反應等植物防禦的相關基因都有提高表現量，所以目前我進行以下實驗規劃：

1. 水楊酸(salicylic acid)的生成與 ROS(reactive oxygen species)的影響：我們將使用 Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS)測試 *efr-1 mutant* 的細胞成分在 Gln 誘導下的水楊酸生成情況，並分析這對活性氧物質 (ROS) 生成的影響，預計利用 DCFH-DA 螢光探針來量化 ROS 的濃度，以評估 Gln 在免疫反應中的潛在角色。
2. 阿拉伯芥抗病側試：我們計畫與 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (PST-DC3000) 病原菌進行共培養，觀察在阿拉伯芥的生長及存活時間以探討 Gln 誘導的 EFR 表達在植物對病原菌感染過程中的作用，並測量植物的抗病能力，分析相關抗病基因的表現變化。
3. MAPKKK 下游訊息傳遞：在目前已知的 EFR 訊息傳遞中，MAPKKK 扮演重要的角色。在阿拉伯芥中，EFR 接收到病原體相關分子模式(PAMP)後會經歷一段複雜的磷酸化、去磷酸化作用活化 *Arabidopsis Botrytis-induced*

kinase 1 (BIK1)啟動 PAMP-triggered immunity (PTI) , 而 MAPKKK 的階段去磷酸化會調控 PTI 的表現 , 而我們已從 q-PCR 發現 MAPKKK 可能與 Gln 誘導的 EFR 訊息傳遞有關。我們將利用西方墨點法 , 觀察 MAPKKK 的表達 , 以評估其對 EFR 介導的訊號轉導及下游基因表現的影響。

本研究將有助於深入理解 Gln 在植物免疫中的功能及其調控機制 , 並為未來的作物改良和病害防治提供理論基礎。

玖、 參考文獻

1. Coruzzi G. M. (2003). Primary N-assimilation into Amino Acids in Arabidopsis. The arabidopsis book, 2, e0010.
<https://doi.org/10.1199/tab.0010>
2. He, ZH., Cheeseman, I., He, D. et al. A cluster of five cell wall-associated receptor kinase genes, Wak1–5, are expressed in specific organs of Arabidopsis. Plant Mol Biol 39, 1189–1196 (1999).
<https://doi.org/10.1023/A:1006197318246>
3. Lal, N. K., Nagalakshmi, U., Hurlburt, N. K., Flores, R., Bak, A., Sone, P., Ma, X., Song, G., Walley, J., Shan, L., He, P., Casteel, C., Fisher, A. J., & Dinesh-Kumar, S. P. (2018). The Receptor-like Cytoplasmic Kinase BIK1 Localizes to the Nucleus and Regulates Defense Hormone Expression during Plant Innate Immunity. Cell host & microbe, 23(4), 485–497.e5.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.03.010>
4. Lea, P. J., & Mifflin, B. J. (1974). Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. Nature, 251(5476), 614–616.
<https://doi.org/10.1038/251614a0>
5. Lee, K.-T., Liao, H.-S., & Hsieh, M.-H. (2023). Glutamine metabolism, sensing and signaling in plants. *Plant and Cell Physiology*, 64(12), 1466–1481. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcad054>
6. Liao, H.-S., Chung, Y.-H., & Hsieh, M.-H. (2022). Glutamate: A

multifunctional amino acid in plants. *Plant Science*, 318, 111238.

<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2022.111238>

7. Liao, H.-S., Lee, K.-T., Chung, Y.-H., Chen, S.-Z., Hung, Y.-J., & Hsieh, M.-H. (2024). Glutamine induces lateral root initiation, stress responses, and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 195(3), 2289–2308.
<https://doi.org/10.1093/plphys/kiae144>
8. Owen, J., & Jonse, A. (2001). Competition for amino acids between wheat roots and rhizosphere microorganisms and the role of amino acids in plant N acquisition. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(4–5), 651–657.
[https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00209-1](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00209-1)
9. Torres-Martínez, H. H., Hernández-Herrera, P., Corkidi, G., & Dubrovsky, J. G. (2020). From one cell to many: Morphogenetic field of lateral root founder cells in *Arabidopsis thaliana* is built. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(34),
<https://doi.org/10.1073/pnas.2006387117>
10. Tseng, C.C., Lee, C.J., Chung, Y.T. et al. Differential regulation of *Arabidopsis* plastid gene expression and RNA editing in non-photosynthetic tissues. *Plant Mol Biol* 82, 375–392 (2013).
<https://doi.org/10.1007/s11103-013-0069-5>
11. Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J. D., Boller, T., & Felix, G. (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell*, 125(4), 749–760. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.037>

【評語】 060011

1. 本研究在探討麩醯胺酸(Gln)誘導阿拉伯芥的受體表現。本研究探討三個麩醯胺酸之受體：wall-associated kinase 2 (WAK2), wall-associated kinase 3 (WAK3)及 the EF-Tu receptor (EFR)。
結果發現在 Gln 的誘導下，在 efr mutant 中表現了防禦相關基因與水楊酸生成之相關基因。
2. 本研究屬初步研究，仍須更進一步的實驗證明其推論。