

國立臺灣大學生物資源暨農學院農藝學系



碩士論文

Department of Agronomy
College of Bio-Resources and Agriculture
National Taiwan University

Master Thesis

水稻肌動蛋白去聚合因子 *OsADF2* 及 *OsADF11* 基因異位
表達於阿拉伯芥中之功能性分析

Functional Analysis of Rice Actin Depolymerizing Factor
OsADF2 and *OsADF11* by Heterologous Expression in
Arabidopsis

馬若瑤

Row-Yu Ma

指導教授：張孟基 博士

Men-Chi Chang, Ph.D.

中華民國 103 年 7 月

July , 2014

誌謝



在研究所這兩年以及能順利完成這篇論文，要感謝的人非常的多，無論是在實驗上的幫助或人生上的支持，沒有大家是無法完成的。首先要感謝指導教授張孟基老師一路上帶領我、教導我各種關於植物在逆境上的反應之相關知識，這兩年所得到的知識及經驗，是以前完全無法想像的。接著要感謝許多老師在實驗材料之支持、儀器上的提供以及方向上的建議。感謝洪傳揚老師提供實驗材料，並且給予學生不同的建議使得實驗更加完整。感謝中研院趙光裕老師以及中研院鄭萬興老師提供實驗材料、實驗技術以及儀器使這篇論文更加的完善。感謝實驗室聯合會議時林彥蓉老師、蔡育彰老師、王淑珍老師提供學生許多不同方向的觀點，使實驗的目標及研究方向更加明確及全方面。感謝黃文理老師、洪傳揚老師、謝旭亮老師、趙光裕老師及張孟基老師口試時提出的問題及討論，在論文初稿的修改上協助學生使之更加完整。

各位實驗室夥伴們的支持鼓勵及意見也幫助了我可以順利完成這篇論文，感謝雅貞學姐、瑩瑋學姐及阿吉學長在實驗上提供很多珍貴的經驗、細心指導以及建議，讓我更加了解實驗的方向、原理及方法，使得研究更加完整。感謝翊雲學長指導我建立構築與產生轉殖株讓我後續的研究更加順利。感謝實驗室的學長姐雪玉姐、子儀、依甄和同儕珮君、晶晶、鈺元和學弟妹松翰和謙謙在實驗上給予許多協助、意見、幫忙及鼓勵，以及班上在其他實驗室的同伴毓安、佳穎、瀟文，還有從大學就一直陪伴我的李銓，除了在實驗上的幫助和資料分析的討論之外，日常生活中的交流聊天也使得我研究所的生涯中不是那麼的枯燥乏味，充滿了歡樂。

最後一定要感謝我的家人，在我念研究所的這段日子不停的支持我、鼓勵我，在我失落低潮時不斷的為我打氣，使我可以順利的完成學業，沒有你們就不會有現在的這篇論文了，謝謝大家！

中文摘要



肌動蛋白去聚合因子 (Actin Depolymerizing Factor, ADF) 為一與肌動蛋白結合之蛋白質，其功能為藉由與 actin 結合將 F-actin 解聚為 G-actin，在細胞中參與了細胞骨架之動態性變化。目前已知 ADFs 和植物細胞之生長發育、形態、細胞分裂、訊息傳導及生物性逆境相關，然而 ADFs 與植物非生物逆境耐受性之關連及其功能仍有待探討。因此本論文之實驗以異位表達之方式，利用 35S 啟動子過量表現水稻 *OsADF2* 及 *OsADF11* 基因於阿拉伯芥中，並觀察轉殖株與野生型外表型及其在非生物逆境下的反應。結果顯示 T₃ 同型結合子之 *OsADF2* 和 *OsADF11* 轉殖株在一般生長情況下轉殖株葉片大小較野生型阿拉伯芥為大，其抽苔時間與開花時間也較野生型為早。一般環境下發芽時間與野生型無差異。然而在 150 mM NaCl 的環境下，35S::*OsADF2* 及 35S::*OsADF11* 轉殖株的發芽時間較野生型阿拉伯芥為早。另外將 5 天大及 10 天大之阿拉伯芥移植至含有 150 mM NaCl 之培養基後發現 *OsADF2* 及 *OsADF11* 轉殖株之根部生長及存活率皆大於野生型阿拉伯芥。另外以乾旱、高鹽、低溫逆境處理 21 天大之 *OsADF2* 及 *OsADF11* 轉殖株成株，結果顯示 *OsADF2* 及 *OsADF11* 皆較野生型耐旱，然而 *OsADF11* 在低溫處理後植物組織有受傷的情形發生，但此現象只在子葉部分觀察到，而新生葉則與野生型無明顯差異。利用紅外線熱影像檢測植株葉溫之變化，在一般條件下轉殖株與野生型葉溫無差異。另一方面以 200 mM NaCl 處理三周大之 *OsADF2* 及 *OsADF11* 轉殖株及野生型阿拉伯芥，則發現 *OsADF2* 轉殖株之葉片溫度與野生型無顯著差異，而 *OsADF11* 轉殖株之葉溫則是較野生型為高。利用玉米 ubiquitin promoter 表現水稻 *OsADFs* 基因家族之 GFP 融合蛋白，接著以暫時性表達分析水稻 *OsADFs* 之次細胞定位，結果顯示水稻 *OsADF2*、*OsADF3* 及 *OsADF11* 與 GFP 之融合蛋白於細胞核及細胞質中皆有表現，其中 *OsADF2* 與 GFP 之融合蛋白在葉綠體中也有表現，而 *OsADF1*、*OsADF4*、*OsADF5*、*OsADF6* 與 GFP 之融合蛋白則是皆表現於葉綠

體中。由以上之結果推論水稻 *OsADF2* 及 *OsADF11* 可能與植物面臨高鹽逆境以及乾旱逆境時的耐受機制有關。



關鍵字：水稻肌動蛋白去聚合因子、細胞骨架、異位表達、植物生長發育、非生物逆境

Abstract



Actin Depolymerizing Factors (ADFs) are small actin-binding proteins that involved in cytoskeleton remodeling in cells. Recently, ADFs were reported to play a role in plant growth, development, cell division, signal transduction and pathogen resistance. However the functions of rice *ADFs* (*OsADFs*) under abiotic stress still remained to explore. In this thesis, we took heterologous gene expression approach to overexpress rice *OsADF2* and *OsADF11* in *Arabidopsis*, and observed the phenotype difference between transgenic and wild type plants under normal growth and abiotic stress. The phenotype of *OsADF2* and *OsADF11* transgenic plants showed bigger leaves size than Col-0, moreover, the bolting time and flowering time was earlier. The germination rate of transgenic plants had no difference compared to wild-type under normal condition while the germination rate of transgenic plants was faster after treatment with 150 mM NaCl. We also transferred the 5-day old and 10-day old seedlings to the 150 mM NaCl medium and found that the root growth and survival ratio of transgenic plants were both higher than wild-type. Next we grown 21-day old *OsADF2*, *OsADF11* transgenic and wild-type plants under drought, salt and cold stresses, and *OsADF2* and *OsADF11* transgenic plants tended to be drought tolerance while injury tissue occurred in *OsADF11* transgenic plant under cold treatment. Using non-destructive infrared thermography camera recorded the leaf temperature change under salt stress condition, the result showed that no obvious differences were found between transgenic and wild-type plants under normal condition. However *OsADF11* transgenic plants showed higher leaf temperature compared to wild-type but not *OsADF2* after treatment with 200 mM NaCl. In addition, to understand the subcellular localization of rice *OsADFs*, we used maize ubiquitin promoter to express rice *OsADFs-GFP* fusion protein through rice protoplast mediated transformation. The

result showed that OsADF3-GFP and OsADF11-GFP were located in the nucleus and cytosol, and OsADF2-GFP was located in the nucleus, cytosol and also in chloroplasts. OsADF1, OsADF4, OsADF5 and OsADF6 were located in the chloroplasts. Taken together from above results, our study implied that rice *OsADF2* and *OsADF11* maybe involve in the plant response to drought and salt stress.

Keywords : Actin depolymerizing factor, Cytoskeleton, Heterologous expression, development and growth, abiotic stresses

目錄



口試委員審定書	i
致謝	ii
中文摘要	iii
Abstract.....	v
表目錄	xi
圖目錄	xi
附錄目錄	xii
縮寫字對照	xiii
第一章 前言	1
第二章 前人研究	3
一、植物在非生物逆境下之反應	3
二、細胞骨架與肌動蛋白於植物之生長發育及非生物逆境耐受性	4
1. 植物細胞骨架之動態平衡	5
2. 細胞骨架之肌動蛋白感應外界環境因子及內生訊號	6
2.1. 溫度	6
2.2. 鹽分	8
2.3. 乾旱	9
2.4. 重金屬	10
三、肌動蛋白去聚合因子(ADF)	10
1. 肌動蛋白去聚合因子 (ADF) 參與植物之生長發育	11
2. 肌動蛋白去聚合因子(ADF) 參與植物之生物逆境耐受性	12
3. 水稻肌動蛋白去聚合因子之相關研究	12
四、研究目的及實驗架構	13
第三章 材料方法	15



一、 <i>OsADF</i> 基因家族之生物資訊分析	15
二、 試驗材料	15
1. 阿拉伯芥種子	15
2. 水稻種子	15
三、 阿拉伯芥生長條件及不同非生物逆境處理	16
1. 阿拉伯芥生長條件	16
2. 阿拉伯芥生理及外表型觀察之非生物性逆境處理條件	16
2.1 發芽率分析之逆境處理條件	16
2.2 根長分析及存活率之逆境處理條件	17
2.3 成株分析之逆境處理條件	17
2.4 遠紅外線熱感應影像分析鹽逆境處理轉植株條件	17
四、 阿拉伯芥突變株及轉植株之分子鑑定	18
1. 植物 DNA 之萃取	18
2. DNA 洋菜瓊脂膠體電泳分析	19
五、 阿拉伯芥突變株及轉植株之基因表現分析	19
1. RNA 之抽取及製備	19
2. RNase Free DNase I 處理	19
3. cDNA 合成之反轉錄反應	20
4. 反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)	20
六、 阿拉伯芥轉植株之質粒構築及逆境耐受性測試	20
1. 35S:: <i>OsADF2</i> 及 35S:: <i>OsADF11</i> 質粒構築流程	20
2. 異位表現(heterologous expression)水稻基因之阿拉伯芥轉殖	21
3. 大腸桿菌轉型作用	22
3.1 大腸桿菌勝任細胞製備	22
3.2 質粒大腸桿菌轉型	22



3.3	檢測轉型後大腸桿菌質粒 colony PCR.....	22
3.4	大腸桿菌質粒 DNA 小量純化	23
4.	DNA 片段的製備與回收.....	23
5.	阿拉伯芥基因轉殖	24
5.1	植物材料預備	24
5.2	農桿菌轉型	24
5.2.1	農桿菌勝任細胞製備	24
5.2.2	質粒農桿菌轉型	24
5.2.3	檢測轉型後之農桿菌質粒 colony PCR.....	25
5.2.4	阿拉伯芥轉殖	25
6.	阿拉伯芥轉殖株篩選	26
6.1	抗生素篩選轉殖株	26
七、	<i>OsADF</i> 基因家族之 GFP 融合蛋白之次細胞位置分析.....	26
1.	<i>Ub::OsADFs-GFP</i> 質粒構築流程	26
2.	水稻材料預備	27
3.	抽取水稻原生質體	27
4.	聚乙二醇(PEG) 轉殖水稻原生質體.....	27
5.	共軛焦顯微鏡 (confocal microscope) 觀察螢光蛋白表現	28
第四章	結果	29
一、	<i>OsADF2</i> 及 <i>OsADF11</i> 基因於非生物逆境下之基因功能分析	29
1.	異位表現水稻 <i>OsADF2</i> 及 <i>OsADF11</i> 基因之阿拉伯芥轉殖株分子鑑定	29
2.	異位表現水稻 <i>OsADF2</i> 及 <i>OsADF11</i> 基因之阿拉伯芥轉殖株外表型觀察	29
2.1.	水稻 <i>OsADF2</i> 及 <i>OsADF11</i> 基因影響阿拉伯芥植株大小	29

2.2.	水稻 <i>OsADF2</i> 及 <i>OsADF11</i> 基因提早植株抽苔開花時間	30
3.	水稻 <i>OsADF2</i> 基因之基因功能性分析	30
3.1.	阿拉伯芥 35S:: <i>OsADF2</i> 轉植株之發芽率測定	30
3.2.	阿拉伯芥 35S:: <i>OsADF2</i> 轉植株於非生物逆境下之觀察	30
3.2.1.	發芽率分析	30
3.2.2.	根長分析	31
3.2.3.	成株觀察	31
4.	水稻 <i>OsADF11</i> 基因之基因功能性分析	33
4.1.	阿拉伯芥 35S:: <i>OsADF11</i> 轉植株之發芽率	33
4.2.	阿拉伯芥 35S:: <i>OsADF11</i> 轉植株於非生物逆境下之觀察	33
4.2.1	發芽率分析	33
4.2.2	根長分析	34
4.2.3	成株觀察	34
二、	水稻肌動蛋白去聚合因子家族 (Actin depolymerizing factor) 之 GFP 融合蛋白於水稻原生質體之次細胞定位	37
第五章	討論	38
一、	探討水稻 <i>OsADF2</i> 及 <i>OsADF11</i> 基因與植物生長發育之關係	38
1.	水稻 <i>OsADF2</i> 及 <i>OsADF11</i> 基因可能參與植物之生長發育及開花	38
二、	探討水稻 <i>OsADF2</i> 及 <i>OsADF11</i> 基因於非生物下之功能比較	40
1.	<i>OsADF2</i> 及 <i>OsADF11</i> 基因參與植物面臨高鹽逆境時的耐受性探討	42
2.	<i>OsADF2</i> 及 <i>OsADF11</i> 基因在低溫逆境下之反應探討	44
3.	<i>OsADF2</i> 及 <i>OsADF11</i> 基因參與植物面臨乾旱逆境時的耐受性探討	45
三、	水稻 <i>OsADF</i> 基因家族之 GFP 融合蛋白次細胞定位結果探討	47
四、	結語	48
	參考文獻	49

表目錄

表一、	水稻肌動蛋白去聚合因子(<i>OsADFs</i>) 家族成員基因序號相關資訊.....	58
表二、	水稻肌動蛋白去聚合因子(<i>OsADFs</i>) 家族成員之次細胞定位.....	58



圖目錄

圖一、	阿拉伯芥過度表現水稻 <i>OsADF2</i> 及 <i>OsADF11</i> 轉殖株之分子鑑定與外表型分析.....	59
圖二、	阿拉伯芥過度表現水稻 <i>OsADF2</i> 及 <i>OsADF11</i> 轉殖株之抽苔及開花時間與野生型 Col-0 之分析比較.....	61
圖三、	阿拉伯芥過度表現水稻 <i>OsADF2</i> 於逆境下根長分析與存活率分析.....	63
圖四、	阿拉伯芥過度表現水稻 <i>OsADF11</i> 之於逆境下根長分析與存活率分析.....	65
圖五、	35S:: <i>OsADF2</i> 轉殖株成株之乾旱逆境觀察.....	67
圖六、	35S:: <i>OsADF2</i> 轉殖株成株之高鹽逆境觀察.....	69
圖七、	35S:: <i>OsADF2</i> 轉殖株成株之低溫逆境觀察.....	70
圖八、	35S:: <i>OsADF11</i> 轉殖株成株之乾旱逆境觀察.....	71
圖九、	35S:: <i>OsADF11</i> 轉殖株成株高鹽之逆境觀察.....	73
圖十、	35S:: <i>OsADF11</i> 轉殖株成株之低溫逆境觀察.....	74
圖十一、	紅外線熱感應影像分析阿拉伯芥過度表現水稻 <i>OsADF2</i> 及 <i>OsADF11</i> 轉殖株於 200 mM NaCl 處理之鹽份逆境下反應.....	75
圖十二、	水稻 <i>OsADFs</i> 基因家族之 GFP 融合蛋白於水稻原生質體之次細胞定位.....	77

附錄目錄



附錄一、	水稻和阿拉伯芥之肌動蛋白去聚合因子家族胺基酸的序列比對及親緣演化樹分析.....	79
附錄二、	水稻肌動蛋白去聚合因子家族基因於不同組織與生長期之表現圖譜.....	80
附錄三、	基因轉殖表現載體構築之質粒圖.....	81
附錄四、	訊息傳遞分子與植物肌動蛋白骨架之關聯圖.....	82
附錄五、	本研究所使用之引子對一覽.....	83
附錄六、	與肌動蛋白相關之研究整理.....	84

縮寫字對照



ADF	Actin depolymerizing factor
ABPs	Actin binding proteins
AF	Actin filament
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
CDPK	Calcium-dependent protein kinase
DNA	Deoxyribonucleic acid
DREB	Dehydration response element binding factor
DW	Dry weight
KD	knock-down
KO	Knock-out
LEAs	Late embryogenesis abundant protein
Lat B	Latrunculin B
M	Molar
MDA	Malondialdehyde
MF	Microfilament
MS	Murashige and Skoog medium
MT	Microtubule
<i>N3</i>	<i>atnced3</i> mutant
<i>Os</i>	<i>Oryza sativa</i> L.
<i>OE2</i>	<i>35S::lfNCED</i> overexpressing line
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylene glycol
PK	Protein Kinase
RNA	Ribonucleic acid

ROS Reactive oxygen species
RT-PCR Reverse transcription polymerase chain reaction
SOD Superoxidase dismutase
TCN1 Taichung Native1
TNG67 Tainung 67
Ubi Ubiquitin
WT Wild type




第一章 前言



近年來地球氣候異常及環境汙染等皆影響了作物生長及發育，此環境變化是限制並影響作物產量及質量之重要因子，進而衝擊了農業生產，導致作物生長異常及產量下降。影響作物產量及質量的逆境可分為生物性逆境與非生物性逆境，生物性逆境如遭受病原菌感染、昆蟲及動物咬傷；而非生物逆境則如高溫、低溫、乾旱、高鹽及重金屬汙染等；近年來對於作物非生物逆境耐受性之反應及訊息傳導已有許多瞭解，但尚未發現植物接受外界環境改變而產生的刺激訊號的接收器 (stress sensor)，目前有許多研究指出當植物面臨逆境時，會產生一連串複雜的調控機制，感應外來的刺激並將訊號傳遞到細胞內 (Osakabe *et al.*, 2013)，進而產生適當的生理反應或形態上的適應，以提高逆境下的生存率，但對於作物如何感應或察覺外在非生物逆境之變化目前仍屬未知。

水稻 (*Oryza sativa* L.) 是世界三大糧食作物 (小麥、玉米、水稻) 之一，食用人口數最多，對於亞洲而言更是主要的生產與消費區域，然而由於人口遽增及氣候變遷導致產量下降，可能會導致未來糧食供應不足，因此探討氣候變遷下增加水稻產量，是現今一大課題。藉由增加水稻抵抗非生物逆境耐受性以提高其產量及品質之研究更為重要。現今主要藉由傳統育種改良增加水稻產量及逆境耐受性，然而水稻中影響生物逆境耐受性的基因大多屬於數量性狀基因，因此若是以傳統育種方式進行改良效果有限。而隨著分子生物技術的發展，基因轉殖技術逐漸成熟，近年來也開始利用基因工程改良水稻對於逆境的耐受性。

當植物受到環境的逆境時，植物的細胞膜及細胞壁最首當其衝而做出反應。而細胞骨架是細胞膜及細胞壁的重要組成成分，目前已有許多證據指出，因應細胞膜流動性之改變，進而影響細胞骨架重整及其上之機械感應器 (mechanical sensor)，與植物感應外界刺激後產生的訊息傳遞鏈有關 (Orvar *et al.*, 2000)。且近年來的研究也指出細胞骨架之重組，在活化非生物逆境之訊息傳遞及下游基因表現上可能扮演了相當重要的感應角色，因此推斷細胞骨架之動態平衡在作物非



生物逆境之變化感知上相當重要 (Blanchoin *et al.*, 2010)。*ADF* 是低分子量 (15-21 kDa) 之小蛋白質，在所有的真核生物中皆可發現，並且在胺基酸序列上具有高度的保守性。*ADF* 可快速的將 Filamentous form actin (F-actin) 去聚合為 Globular form actin (G-actin)，以調控細胞中肌動蛋白之動態平衡，是影響植物細胞骨架聚合動態性變化最重要因子之一。植物之 *ADFs* 基因研究起始於百合與玉米，而模式植物之阿拉伯芥的 *AtADF* 多基因家族，則可分為營養生長和生殖生長期表現之兩大群，分別表現於不同的組織與生長發育期，並且與特定的調節功能有關 (Ruzicka *et al.*, 2007)。除了與植物之正常生長發育，如開花、花粉管之生長有關外，*AtADFs* 多被證明與植物病菌 (plant-pathogen interaction) 之相關耐性，具有正向調控之功能。

目前對水稻 *OsADFs* 基因家族之研究並不多，尤其是有關之基因功能及與非生物逆境之相關性。因此本論文旨在分析水稻 *OsADF* 基因家族之基因功能。首先以功能性基因體學方式產生獲得功能之 gain of function (GOF) 異位表現水稻基因之阿拉伯芥轉殖株，進行生理及外表型分析以及在非生物逆境下之耐受性測試。接著分析 *OsADFs*-GFP 融合蛋白在細胞中的表現定位。藉由上述水稻肌動蛋白去聚合因子基因家族之生理、耐性測試及蛋白質定位，將可使我們更加了解水稻 *OsADF* 基因家族如何影響水稻生長發育，並可能在胞膜流動性及細胞骨架重整上，如何作為一感知之訊息以活化非生物性逆境下游之基因表現。



第二章 前人研究

由於植物與動物不同，沒有運動機能以及神經系統。植物通常生長於固定位置，當環境發生變化時，無法主動離開這些逆境，因此對於環境訊號及內生發育訊號之感應，在植物的形態及耐性上有所變化，使植物得以面對逆境而存活是非常重要的。植物利用感應這些外界變化訊息，使植物產生對應刺激之基因表現變化、產生逆境對應蛋白質及代謝物，以改變自身的生長發育，進而使植物體得以面對環境變化，而增加存活機率。所以刺激訊息的接收以及訊息傳遞對於植物的生長發育、環境反應而言是十分重要的。當植物遭遇到非生物逆境（如高鹽、高溫、低溫、乾旱、重金屬…等）時，其生長發育會受到影響，因而造成在外部形態、生理以及代謝上的改變，或是引發參與訊息傳遞或耐受性反應基因的表現，近年來的研究指出，細胞骨架的形態上之動態變化，以及參與植物體內之訊息傳遞而影響下游生理反應 (Marylin *et al.*, 2002)，因此細胞骨架之重組 (remodeling) 於耐逆境之生理生化功能，在植物體中可能扮演重要的角色。

一、植物在非生物逆境下之反應


當環境發生變化，如非生物逆境等，植物體感應到此變化後會產生一連串的生理代謝反應。初期反應為調控相關基因表現量，進而改變代謝產物生成，使植物體得以面對環境變化的改變而存活。植物在面臨環境逆境時有許多不同因應機制，如趨避性 (escape)、防禦性 (avoidance) 及耐受性 (tolerance) (Chaves *et al.*, 2003)，趨避性大多出現於生長於沙漠之短生命週期之植物，其為避開平時乾旱逆境而只在短暫降雨中萌芽並迅速完成生命週期。防禦性則是植物藉由增加本身之逆境防禦能力，如沙漠中植物根系發達，或是演化出針狀葉、厚角質層等以減少水分散失而得以於乾旱環境中存活。植物產生逆境耐受性主要透由兩方面：一為植物體在接收到外界之逆境後誘導特定基因表現，進而產生對應之代謝產物或蛋白質而得以自行消弭或修復逆境對植物體所造成的損害，使植物保持正常生理功



能而存活，二則為外來因素及人工選擇培育，如通過雜交育種、基因工程、誘變選拔等。基於達爾文的物競天擇、適者生存的理論，生物體在自然情況下遭遇逆境時具備有利變異條件者存活，而造成有利的基因型在族群中比例逐漸上升，長時間後逐漸累積變異，最後形成自然下無法與原種族群孕育下一代之新族群 (Darwin, 1859)。迄今為止在植物抵抗逆境的研究方面，無論是在代謝機制、分子層次基因定位或是遺傳研究方面已有很大之進展，目前在增加植物抵抗逆境耐受性之途徑有以下兩種：一為利用遺傳學傳統之育種，對植物形態結構及生長發育進行調控篩選；二為透過生物技術對植物之代謝途徑以及基因表達進行調控。然而現今之環境變化劇烈，此產生具有耐受性品種之速度遠不及環境之變化改變，因此生物轉殖技術為另一種增加耐性品種之選擇。利用轉殖技術可將目標性狀相關基因，插入欲改良之目標生物體中，並且控制其表現量、表現部位等，此技術可突破不同物種間的繁殖隔閡，可選擇之基因可來自於不同物種甚至是人為基因，而可增加目標性狀的表現。在轉殖作物上之應用如增加作物產量、產生特定蛋白以及具有某些逆境耐受性等，進而培育出可抵抗逆境之作物。迄今為止已有許多研究將非生物逆境有關之外源功能性蛋白基因（如水通道蛋白、滲透壓調節蛋白、抗凍蛋白及熱休克蛋白等）導入植物細胞並大量表現之，結果顯示可增加植物對非生物逆境之耐受性 (review by Arbona *et al.*, 2013)。

二、 細胞骨架與肌動蛋白於植物之功能

細胞骨架主要由細胞微管 (microtubules)、細胞微絲 (microfilament) 及中間絲 (intermediate filament) 所組成，其中前二者主要參與了植物細胞中之細胞骨架之動態性平衡 (dynamic rearrangement of cytoskeleton)，此動態平衡在植物之生長發育、荷爾蒙作用甚至外界訊息之感知及傳遞上皆扮演重要之角色 (Drøbak, Franklin-Tong *et al.*, 2004; Hussey *et al.* 2006)。植物細胞骨架一般為蛋白纖維組成之三維網狀結構，在植物細胞之中參與除了維持細胞基本的形狀穩定外，在植物



高度特異化的細胞（如花粉管、根毛、茸毛 (trichome) 及氣孔保衛細胞等）形態發生及功能有重要的作用，並且也參與了細胞許多生理活動如：胞內運輸、胞器運移、離子通道之開啟/關閉、訊息傳導、細胞生長及分裂、細胞形狀變化、細胞向性生長以及細胞質流等 (Henty-Ridilla *et al.*, 2013; Deeks and Hussey 2009; Ye *et al.*, 2013)。細胞骨架藉由參與以上生理活動而維持植物細胞之正常功能，使植物體得以正常生長發育；近年來也有許多研究指出細胞骨架參與了非生物逆境及生物逆境下，植物感應而產生之訊號傳遞路徑 (review by Nick, 2008; review by Schmelzer, 2002)。

1. 植物細胞骨架之動態平衡

植物細胞骨架的動態平衡對於維持一個細胞在穩定的狀態而言十分重要的，而此動態平衡主要是指細胞微管及肌動蛋白不停地由球形單體肌動蛋白 (Globular form actin, G-actin) 聚合為聚合態絲狀肌動蛋白 (Filamentous form actin, F-actin)，以及 F-actin 去聚合為 G-actin 所構成。藉由與肌動蛋白結合蛋白質群 (Actin Binding Proteins, ABPs)，如 Arp2/3 複合體 (Actin related protein 2/3 complex)，肌動蛋白抑制蛋白 (profilin)、肌動蛋白去聚合因子 (Actin depolymerizing factor, ADF/cofilin)、肌球蛋白 (myosin)、纖維蛋白 (fibrin) 及 Geosolin/villin 等所共同調節 (Wasteneys *et al.*, 2004)。透由以上 ABPs，與肌動蛋白絲之 C 端或 N 端之 G-actin 結合，將絲狀肌動蛋白解聚或聚合而形成細胞內細胞骨架之動態平衡。在生理鹽濃度下及存在 ATP 及 Mg^{2+} 的環境下，球狀肌動蛋白會自發聚合成絲狀肌動蛋白，此聚合作用有以下四步驟：(1) 活化肌動蛋白 (activation)，肌動蛋白單體與鹽類結合，並且改變構型；(2) 成核反應 (nucleation)，由單體結合之低聚體逐漸結合成絲狀肌動蛋白多聚體；(3) 肌動蛋白微絲延長 (elongation)，由多聚體兩端逐漸延長；(4) 肌動蛋白微絲聚合 (annealing)，兩條已形成之絲狀肌動蛋白兩端相互接合 (Pollard *et al.*, 1986)。在一般情況下，穩定的細胞內之細胞骨架處於一動態性平衡，游離之 G-actin 濃度會處於臨界濃度，此時結合到兩端之肌動



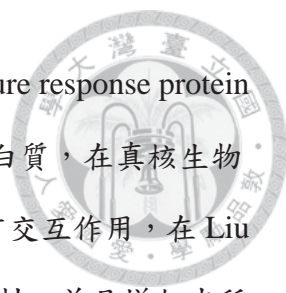
蛋白與從兩端解離之肌動蛋白一樣多，意即細胞骨架之去聚合速率與聚合速率相等達到平衡 (Ono *et al.*, 2007)。

2. 細胞骨架之肌動蛋白感應外界環境因子及內生訊號

目前已有許多研究及證據證明植物細胞骨架參與許多不同的訊息傳遞鏈，包括植物感應外界非生物訊號如感覺、滲透壓、溫度 (Nick, 2008) 以及生物訊號 (Schemelzer, 2002)。植物感應訊號可分為三個主要事件：感知刺激、產生訊息、訊號傳遞，進而影響到後續下游生化反應途徑 (Yamaguchi *et al.*, 2000)。而 Eun 及 Lee 於 1997 年發現肌動蛋白在氣孔關閉時，會由組織完整的狀態 (well-organized) 轉為解體鬆散 (disorganized) 的型態 (Eun and Lee, 1997)，且 Hwang 及 Lee 於 2014 年也發現肌動蛋白參與調控保衛細胞體積，而推論肌動蛋白參與調控細胞膜上離子通道活性 (Hwang and Lee, 2014)。在內生生理訊號上，目前已有許多研究指出植物細胞骨架也參與了植物生長發育功能，如生長素(Auxin) 在植物細胞中的運移也和細胞骨架構型有密切關係，藉由細胞骨架與 PIN 蛋白間的交互作用，而影響生長素在細胞內的運移，進而影響植物之生長 (Nick, 2013; Paque *et al.*, 2014)。當植物遭受到強光時，葉綠體的垂直移動也受到細胞內之細胞骨架所調控，而植物感應地心引力而具有向地性，也與細胞骨架關係密切，因此植物細胞骨架的穩定性與維持一個細胞的正常功能息息相關。

2.1. 溫度

植物之抗冷性一直都是研究植物逆境耐受性的重要目標之一，研究發現極端溫度的改變（高溫或低溫），會造成肌動蛋白細胞骨架的結構變化，低溫逆境會造成植物肌動蛋白去聚合化，刺激鈣離子進入細胞，且會使植物體內累積大量自由基而導致膜受到損害 (Mazars *et al.* 1997; Orvar *et al.* 2000; Pokorna *et al.* 2004; D'Angeli and Altamura 2007)。以低溫處理冬油菜懸浮培養細胞的纖維型肌動蛋白 (Fibrous actin, F-actin)，會使得 F-actin 解離為球型肌動蛋白 (Globular actin, G-actin)



(Egierszdorff and Kacperska, 2001)。水稻 *LTRPK1* (low-temperature response protein kinase 1) 為一屬酪蛋白激酶 I (Casein kinase I, CKI) 家族之蛋白質，在真核生物中作為訊息傳遞路徑之調控因子，並且與肌動蛋白相關蛋白具有交互作用，在 Liu 等人 (2012) 的研究中指出，此蛋白可以穩定水稻之細胞膜穩定性，並且增加水稻的低溫耐受性 (Liu *et al.*, 2012)。Abdrakhamanora 等人 (2003) 證實小麥以低溫及 ABA 處理後發現細胞骨架有重整 (re-organized) 現象，以 4°C 處理具耐冷性之小麥根部 7 天，發現細胞骨架會因低溫處理而短暫崩解，但隨著逐漸回溫恢復生長條件，耐冷性小麥之細胞骨架可重新恢復聚集，但不耐冷者則無法形成聚集，此結果顯示植物細胞骨架之去聚集與小麥低溫之感知有關 (Abdrakjamanora, 2003)。


Örvar 等人 (2000) 以 DMSO (membrane rigidifier) 或 cytochalasin D (actin microfilament destabilizer) 處理苜蓿之懸浮培養細胞，證實可在 25°C 模仿冷馴化之條件下，誘使 CAS30 (cold acclimation specific gene) 表現。相反的即使在 4°C 下，若以 Benzyl alcohol (membrane fluidizer) 及 Jaspakinolide (actin microfilament stabilizer) 處理苜蓿細胞，則會抑制鈣離子之流入且使 CAS30 基因無法表現。另外 Sangwan 等人 (2001) 以油菜 (*Brassica napus*) 轉植株之圓葉盤 (leaf disc) 為材料，利用 BN115 (cold-induced gene) 啟動子驅動 GUS 報導基因，若在 25°C 以 DMSO 及 Latrunculin B (micro filament destabilize) 或 oryzalin/colchicine (microtubule destabilize) 可誘導 GUS 之表現，反之即使在 0°C 下，以 Benzyl alcohol、Jaspakinolide、taxol (microtubule stabilizer) 及 Gd³⁺ (calcium channel blocker) 則會抑制 GUS 之表達。此些證據指出細胞骨架之重整在低溫之訊息傳導、鈣離子流入及基因表現中是必需的。Oullet 等人 (2001) 分離並鑑定了一會被低溫誘導之小麥肌動蛋白去聚合因子 (*TaADF*)，在冷馴化耐冷的小麥品種中，發現此 *TaADF* 的大量累積，且此累積特性只對低溫誘導表現具有專一性，因此推論此小麥 *TaADF* 可能與低溫馴化，而非起始之低溫感知有關 (Oullet *et al.*, 2001)。此外高溫處理也會影響植物之細胞骨架肌動蛋白的結構。Müller 等人 (2007) 以阿拉伯芥根部活的表皮

細胞為材料，發現以 40~41°C 之高溫短暫處理會使細胞骨架發生去聚集現象；而當回復到 20°C 後 1-3 小時內，即可重新恢復原先之結構，且此過程與細胞種類及發育時期有關 (Müller *et al.*, 2007; Malerba *et al.*, 2010)。

綜合上述前人關於溫度與植物細胞骨架、肌動蛋白間的研究報告中，可以了解外界之溫度變化，無論是高溫或是低溫，皆會改變肌動蛋白細胞骨架之結構，並且在這些刺激結束後具有可回復之能力，同時也得知細胞骨架應參與植物細胞感應外界溫度改變之訊息傳遞路徑，雖目前對此訊息傳遞路徑仍尚待研究。

2.2. 鹽分


土壤的品質對於植物生長發育甚至是產量而言影響甚鉅。近年來世界上已有許多地方之土壤已遭受到鹽鹼化，因此找尋使植物對於鹽份更加具有耐受性的基因或是機制，是目前生物技術上解決此問題的方法之一。鹽份逆境短期內會造成滲透壓之改變，長期則鈉離子之累積。Lu 等人 (2007) 之研究顯示，若以 microtubule destabilizer 或 stabilizer 處理玉米根尖，可提高玉米根尖細胞對滲透壓逆境之敏感性，並促進離層酸 (ABA) 之含量增加。此研究表示，藉由細胞骨架之重整與滲透壓逆境間彼此之交互作用，可導致細胞內 ABA 生合成之增加而提升耐受性，然而其中確切的機制仍不太清楚 (Lu *et al.*, 2007)。在研究鹽份逆境對於細胞骨架的研究上，Wang 等人以 paclitaxel 處理阿拉伯芥幼苗，發現導致更多幼苗於鹽逆境下死亡，相反的若以 oryzalin 或是 propyzamide 處理，反而減少阿拉伯芥幼苗在鹽逆境下之死亡率 (Wang *et al.*, 2011a)。當加入鈣離子於培養基中，則可回復細胞微絲之重新組織並提高存活率，然而若是加入了鈣離子通道蛋白抑制劑 (如 LaCl_3)，會降低阿拉伯芥幼苗於鹽份逆境下的存活率，以上結果皆表示細胞微絲不穩定會造成細胞內鈣離子濃度之變化，進而造成植物細胞對鹽逆境之感知變異 (Wang *et al.*, 2007)。而高鹽處理除了對植物造成高鹽逆境外，也會造成離子逆境之滲透壓改變以及後續的超氧化物累積逆境因此造成植物氧化逆境 (Mittler *et al.* 2004)。



此過氧化物累積的現象同時在以肌動蛋白穩定劑以及肌動蛋白聚合抑制劑處理後於植物根部中發現，因此破壞肌動蛋白原生之動態平衡會導致過氧化物累積進而使植物受到危害 (Liu *et al.*, 2012)。另外在滲透壓對於肌動蛋白穩定度的研究上，Komis 等人發現高滲透壓處理吊蘭 (*Chlorophytum*) 之葉部細胞，會造成細胞微絲之重組 (Komis, 2002)。Liu 等人指出利用改變植物肌動蛋白動態平衡之藥劑 (stabilizer/ destabilize)，會影響過氧化物在阿拉伯芥根部的累積，且在鹽份逆境下若是再以肌動蛋白聚合抑制劑 (如 Latrunculin B) 處理，會使植株對鹽逆境更加敏感，然而若是以肌動蛋白穩定劑 (如 phalloidin) 處理植株，則會增加植株的存活率 (Liu *et al.*, 2012)。另外 Actin-related protein 2/3 complex 是一與肌動蛋白結合之蛋白質，Zhao 等人於 2013 年利用分析 Arp2/3 突變株於鹽份逆境下的生理反應，由結果顯示，此肌動蛋白結合蛋白之突變株對鹽份逆境較敏感，且會造成細胞內鈣離子濃度高度上升，並影響到後續之訊息傳遞途徑 (Zhao *et al.*, 2013)。以上研究皆顯示植物細胞骨架及肌動蛋白會受到外界環境改變而影響其構型及穩定性，進而影響到植物對鹽之生理反應以及耐受性。

2.3. 乾旱

乾旱是影響作物產量之重要限制因子之一，為研究非生物逆境之重要研究目標。2005 年 Ghulam 等人藉由對兩週大之水稻進行乾旱測試，抽取其葉鞘之蛋白質進行分析，結果顯示具有 10 種蛋白質明顯大量表現，而有兩種蛋白質則是含量減少。將這些蛋白質進行分析後發現，這些蛋白質與植物抵禦性、能量產生、代謝作用、細胞結構以及訊息傳導有關。而為了瞭解與乾旱逆境之關係，Ghulam 等人又以不同之逆境處理分析水稻之蛋白質，發現一水稻 OsADF 會受到乾旱及滲透壓逆境誘導而大量累積，而不會因低溫處理或賀爾蒙處理而改變其含量，且在耐旱之水稻品中即使是未經乾旱處理即具有大量之 OsADF 之表現，顯示水稻 OsADF 蛋白質為乾旱逆境下之誘導表現目標之一 (Ghulam *et al.*, 2005)。而 Liu



等人以蛋白質體學分析不同乾旱耐受性之水稻，以乾旱處理後結果發現 *OsADF5* 在乾旱逆境下之營養發育時期會大量累積，但若重新灌水則會消失而沒有累積。當進一步以 IR64 抽穗前 3 天之植株進行乾旱處理及 ADF 表現分析，可知 ADF 亦存在於劍葉、穗柄及雄蕊中，表示此 ADF 與水稻乾旱逆境耐受性有關 (Liu, 2005)。以上研究皆指出，乾旱逆境處理會影響到 ADF 之表現，然而後續之植物反應則仍尚待研究。

2.4. 重金屬

重金屬污染是研究非生物逆境之重要研究目標，也是目前危害台灣農業重要因子之一。主要是直接對植物吸收物質養分之根部造成傷害，進而導致植株死亡。如鎘 (Cd) 及鋁 (Al) 的毒性會快速地對植物產生毒性，並且使根部停止生長。2012 年 Krtková 等人的研究中指出，以鋁處理阿拉伯芥根部發現初期即出現細胞膜系穩定度受到損害，造成植物根部停止生長，因此作者推論，植物在遭遇到鋁毒害，所造成的植物損傷和細胞膜的穩定度有關 (Krtková *et al.*, 2012)。而在鎘對於植物之毒害研究，當植物接受到 Cd 離子會導致植物細胞內的鈣離子濃度下降，並且會造成內質網及粒腺體的構造破壞，接著由於鈣離子的濃度改變也會影響到肌動蛋白微絲的解聚，進而導致植物根部停止生長 (Wan *et al.*, 2012)。

三、 肌動蛋白去聚合因子(ADF)

對於動物的 ADF 目前已有大量的研究，而對於植物的 ADF 則是研究較少。近年來由玉米、百合開始漸漸有所研究，接著在阿拉伯芥、菸草以及棉花等植物中也都有相關的研究報導 (Hussey *et al.*, 1998; Jiang *et al.*, 1997a; Jiang *et al.*, 1997b; Gungabissoon *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2010)，而此些早期關於植物 ADF 大都是證明其與植物之型態發生以及型態構成有關。

肌動蛋白去聚合因子為 16-20 kDa 的小分子蛋白，是調控細胞骨架之肌動蛋白之聚合與去聚合之動態平衡之重要因子 (Maciver *et al.*, 2002)。肌動蛋白藉由

Mg²⁺、K⁺和 ATP 的作用下，由單體球型之 G-actin (globular) 聚合形成具有極性的雙螺旋絲狀聚合體線形之 F-actin (filamentous) ，而肌動蛋白去聚合因子藉由與 G-actin 結合，將 F-actin 去聚合為單體球型之 G-actin ，ADF 與肌動蛋白之間的交互作用受 pH 值、可逆性磷酸化及特定磷酸肌醇所調控 (Allwood *et al.*, 2002; Smertenko, 2010; Dong *et al.*, 2013) 。

阿拉伯芥 *AtADF* 基因家族具有 11 個成員，Ruzicka 等人 (2007) 利用轉殖阿拉伯芥 *AtADF* 啟動子 *AtADFpro::GUS* 分析阿拉伯芥 *AtADF* 之表現位置以及組織專一性。發現這些基因會受到不同發育時期之調控。以演化上來分析阿拉伯芥 *AtADF* 成員可分為四個次群 (subgroup) ，在基因的層級上，第一個次群主要是表現於營養生長時期及除了花粉管之外的生殖組織中持續性表達；第二個分群是專一性的高度表現於成熟的花粉以及花粉管中，同時也有在根部表皮的茸毛 (trichome) 及根毛中發現其表現，此現象在單子葉的水稻中也有發現；第三個次群的 *AtADF* 則是在營養生長期表現但表現量較低，只有在快速生長或分化的細胞中 (如癒合細胞 callus、初生葉、分化組織) 較高；最後第四個次群的 *AtADF* 是持續性在所有組織中表達。而在蛋白質的表現上，則是分為兩個次群，第一次群位於阿拉伯芥葉肉細胞之細胞質以及核中表現，而第二次群則是主要在根毛以及花粉管的尖端及延長部位之細胞質中表現 (Ruzicka *et al.*, 2007) 。

1. 肌動蛋白去聚合因子 (ADF) 參與植物之生長發育

肌動蛋白纖維藉由與細胞質、細胞膜或是細胞內其他胞器相連接，以維持細胞之正常功能，如根毛的延伸、花粉管之萌發、葉子絨毛之伸長等現象肌動蛋白都參與其中。Dong 等人於 2001 年的研究中指出，阿拉伯芥 *AtADF1* 控制阿拉伯芥細胞延長以及生長，並且過度表現 *AtADF1* 可以提早阿拉伯芥開花時間，反之減少 *AtADF1* 的表現會延遲阿拉伯芥的開花時間 (Dong *et al.*, 2001) 。而阿拉伯芥 *AtADF7* 及 *AtADF10* 也在研究中被發現此二者與阿拉伯芥花粉管分化時的特定細



胞延長功能有關 (Daher *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2013)。

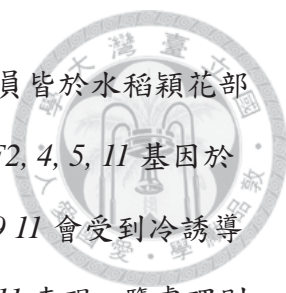
在 ADF 的研究還有利用異位表達外來基因進行轉殖植物之外表型分析，如 2013 年 Chi 等人利用異位性表達棉花 *GbADF1* 轉殖於菸草中進行研究。首先先利用胺基酸序列 alignment 比對兩個物種之 ADF 相似性，並且利用南方及北方墨點轉漬技術 (Southern and Northern blot) 證明並確認此轉殖 *GbADF1* 之菸草中可以正常的產生出 *GbADF1* 蛋白質，接著觀察到 T₁ 轉植株表現較短的下胚軸以及具有較少的根毛，且轉植株之氣孔有被誘導關閉的傾向，而在開花時間的方面則是發現轉植株較野生型為延遲五天；接著觀察 *GbADF1*-GFP 融合蛋白之螢光發生位置了解其表現位置發現此融合蛋白表現在洋蔥之細胞核以及細胞骨架內，以上結果顯示此 *GbADF1* 在棉花的細胞生長分化中扮演重要的角色。(Chi *et al.*, 2013)。

2. 肌動蛋白去聚合因子(ADF) 參與植物之生物逆境耐受性

阿拉伯芥之 *AtADF* 不只參與了植物之生長發育，同時也參與了植物對抗生物逆境下的耐受性。2009 年 Tian 等人利用反向遺傳學 (Reverse genetics approach) 分析阿拉伯芥 *AtADF4* 在 *Pseudomonas syringae* pv *tomato* 上的抗病途徑，由結果中顯示和一般抗病性之細胞骨架調控機制不同。*AtADF4* 是藉由調控細胞骨架之抵抗訊息途徑來增加植物之耐病性，顯示 ADF 使植物具有耐受性之機制不只是藉由改變細胞骨架之動態平衡，某種程度上也參與了植物耐受機制之反應訊息傳遞路線 (Tian *et al.*, 2009; Katie *et al.*, 2012)。

3. 水稻肌動蛋白去聚合因子之相關研究

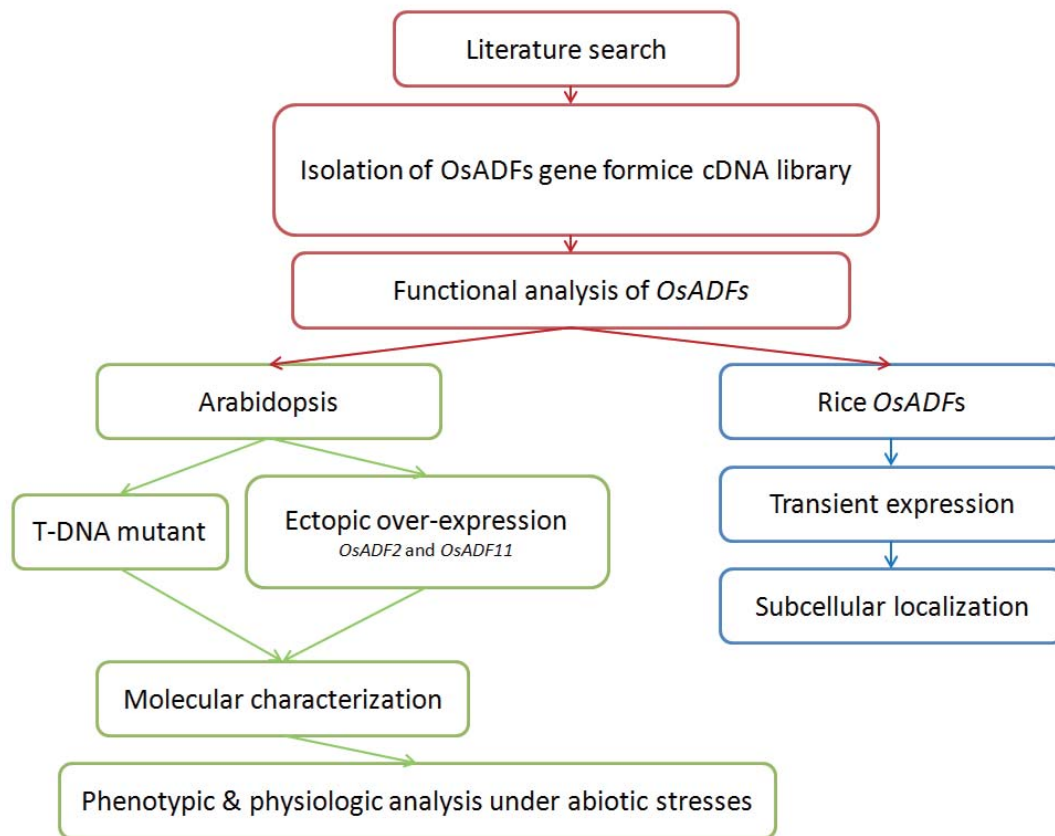
如前面說明乾旱逆境與肌動蛋白間之關係中提到 2005 年 Liu 等人發現水稻中具有一 ADF 與水稻乾旱逆境耐受性有關 (Liu, 2005)。而 Feng 等人於 2006 年以生物資訊方法進行阿拉伯芥與水稻基因資料庫的 ADFs 資料整合，研究發現可能至少各有 11 個 ADF 基因存在於阿拉伯芥與水稻基因組中 (Feng *et al.* 2006)。我們實驗室的黃雅貞學解分析了水稻 *OsADFs* 基因家族在不同時期、部位、賀爾蒙以及



不同非生物逆境的轉錄表現，結果指出所有水稻 *OsADF* 基因成員皆於水稻穎花部位表現，其中 *OsADF2, 4, 5, 11* 基因表現於所有組織，而 *OsADF2, 4, 5, 11* 基因於不同的生長間表現於所有組織中，在基因表現方面 *OsADF1, 3, 9, 11* 會受到冷誘導表現 (附錄二)，而以 ABA 處理後則是會誘導 *OsADF1, 3, 5, 9, 11* 表現，鹽處理則是只有 *OsADF3* 有明顯大量受到誘導表現，乾旱處理的基因表現結果則是 *OsADF3, 10* 有大量表現的現象發生 (附錄二)。接著利用 35S 啟動子過度表現水稻 *OsADF3* 基因於阿拉伯芥中分析 *OsADF3* 轉殖株在逆境下的表現，發現異位過度表現水稻 *OsADF3* 基因可增加阿拉伯芥轉殖株對滲透壓及乾旱逆境的耐受性 (Huang *et al.* 2012)。

四、 研究目的及實驗架構

由上述研究中可得知目前對於阿拉伯芥等物種的 ADF 已有相當程度的了解，無論是在植物形態上或是非生物逆境 (如鹽害、高/低溫、滲透壓逆境等) 下的功能，已有許多研究發表，然而水稻的 ADF 的功能目前尚待探討。再者，由於目前已有許多研究指出植物細胞骨架、肌動蛋白的穩定性或是動態平衡在植物的生長發育以及面臨非生物逆境 (如低溫、鹽害等) 時的訊息傳遞途徑及反應扮演了十分重要的角色，因此推論 ADF 可能和植物面臨非生物逆境的耐受性有關。本篇研究首先由水稻資料庫中找出 *OsADFs* 基因家族，先以功能性基因體學方式研究 *OsADF2* 及 *OsADF11* (同屬於 *OsADF* 基因家族之 A 群) 異位表現水稻基因於阿拉伯芥中，進行非生物逆境下之基因表現、生理以及外表型分析，以了解水稻 ADF 在植物面臨非生物逆境時的生理反應。接著利用 PEG transfectin 暫時性表達水稻 *OsADF* 基因家族與 GFP 之融合蛋白於水稻原生質體中，利用共軛焦顯微鏡觀察其表現位置，並探討其可能參與之細胞功能。實驗架構如下頁所示。



圖一、實驗架構圖

第三章 材料方法



一、 *OsADF* 基因家族之生物資訊分析

根據本實驗室博士班黃雅貞學姐的論文針對已解序之水稻基因組進行肌動蛋白去聚合因子家族基因的核苷酸與蛋白質序列搜尋，並參考目前已發表文獻整理製表，使用 Vector NTI 軟體之 AlignX 功能 (Vector NTI, v9.0, Informax) 進行序列比對，以水稻 KOME 資料庫及基因作所獲得的胺基酸序列使用 ClustalX (v1.83) 與 Treeview (v1.6.6) 進行親緣演化樹的建立 (附錄一)。搜尋基因序列相關網址：NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)、KOME database (<http://cdna01.dna.affrc.go.jp/cDNA/>)。

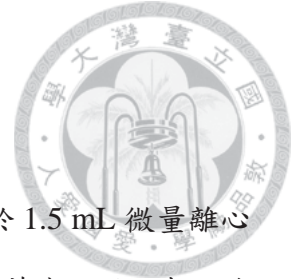
二、 試驗材料

1. 阿拉伯芥種子

野生型阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia, Col-0) 種子及 Col-0 背景之 T-DNA 突變株種子，分別由臺灣大學農藝系王淑珍教授實驗室提供，以及美國俄亥俄州州立大學 Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC, OH, USA) 機構 (<http://abrc.osu.edu>) 所申請。另外由實驗室博士後研究員陳鴻吉學長提供 (Chen *et al.*, 2011) 的過度表現鐵砲百合 (*Lilium formosanum*) ABA 生合成基因 *NCED3* (9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 3) 之 *OE2* 品系 (*35S::LfNCED3*)，及阿拉伯芥 *NCED3* 突變品系 *N3* 種子 (*atnced3*)，作為在鹽份逆境耐受性上諸如種子萌芽率、生長勢等的正向調控以及負向調控控制組，以確定逆境處理是否有效。

2. 水稻種子

粳稻日本晴 (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare)、台農 67 號 (*Oryza sativa* L. cv. Tainung 67) 及秈稻台中在來 1 號 (*Oryza sativa* L. cv. Taichung Native 1, TCN1)。TCN1 為 99 年第二期作種植於臺灣大學農場；TNG 67 為 99 年第一期作。



三、 阿拉伯芥生長條件及不同非生物逆境處理

1. 阿拉伯芥生長條件

阿拉伯芥於介質土壤之培養條件：取適量阿拉伯芥種子置於 1.5 mL 微量離心管中冰於 4°C 冰箱中兩天，進行春化作用以打破其休眠而使之發芽率一致。春化作用結束後均勻灑播在已滅菌之培養土上（培養土：蛭石：珍珠石 = 2:1:1），接著移至 22/18°C（日溫/夜溫），長日照 16/8 小時光照（光照強度 120-150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ ）及黑暗周期之生長箱中，濕度為 60% (60% RW)，每週澆 2 次水，施灑肥料（花寶 3 號）以一週一次為限。阿拉伯芥於培養皿之無菌培養條件：將適量阿拉伯芥種子置於微量離心管中，於無菌操作台中加入 1 mL 70% 酒精震盪 7 分鐘，短暫離心後去除酒精，加入 1 mL 1-2% NaOCl（含 0.05% Tween-20）震盪 10 分鐘後，離心去除 NaOCl，以無菌水震盪清洗種子至少 4-5 次，直到不再出現泡沫，加入 1 mL 無菌水放入 4°C 冰箱進行春化作用，兩天後去除無菌水並加入新的 1 mL 無菌水將種子均勻灑播在固態培養基上，接著以透氣膠帶封住培養皿移置 22/18°C（日/夜溫）、16/8 小時光照及黑暗周期之生長箱中。

2. 阿拉伯芥生理及外表型觀察之非生物性逆境處理條件

2.1 發芽率調查之逆境處理條件

試驗材料為阿拉伯芥野生型 (Col-0)、35S::*LfNCED3* 轉植株 (OE2)、*atnced3* 突變株 (N3) 與過度表現水稻 *OsADF2*, *OsADF11* 基因轉植株種子 (T₃) 各約 100 顆，消毒及春化處理後均勻灑於不同逆境之 1% sucrose, 8 g/L Agar 1/2 MS (SIGMA) 培養基中：對照組為 1/2 MS 培養基；高鹽逆境為含有 150 mM (J.TBaker) 之 1/2 MS 培養基。以透氣膠帶封住培養皿，置於 22/18°C（日/夜溫），16/8 小時光照及黑暗周期之生長箱中 1~7 天，計算每天發芽率，而發芽率之標準為以胚根突破種皮後計算。



2.2 根長測量及存活率之逆境處理條件

試驗材料為阿拉伯芥野生型 (Col-0) 、35S::*LfNCED3* 轉殖株 (OE2) 、*atnced3* 突變株 (N3) 與過度表現水稻 *OsADF2*, *OsADF11* 基因轉殖株種子 (T₃) 各約 100 顆，消毒及春化處理後均勻灑於 1% sucrose, 8 g/L Agar, 1/2 MS (SIGMA) 培養基中，置於 22/18°C (日/夜溫)，16/8 小時光照及黑暗周期之生長箱中生長至 5 天大及 10 天大，移植至不同逆境之 1/2 MS (SIGMA) 培養基中培養 4 天后測量根長以及存活率：對照組為 1/2 MS 培養基；高鹽逆境為含有 150 mM NaCl (J.T Baker) 之 1/2 MS 培養基，各處理 3 重複，以透氣膠帶封住培養皿，垂直置於 22/18°C (日/夜溫)，16/8 小時光照及黑暗周期之生長箱中，生長 4 天後照相紀錄，定義葉片白化者為死亡，而維持綠色葉片者則為存活。

2.3 成株觀察之逆境處理條件

試驗材料為阿拉伯芥野生型 (Col-0) 、35S::*LfNCED3* 轉殖株 (OE2) 、*atnced3* 突變株 (N3) 與過度表現水稻 *OsADF2*, *OsADF11* 基因轉殖株，經過春化作用後均勻灑於含有介質之 3 吋盆上，置於 22/18°C (日/夜溫)，16/8 小時光照及黑暗周期之生長箱中，生長至 10 天後分別疏苗，接著每周以花寶三號進行施肥。生長至 21 天大後進行逆境處理：對照組為不做處理正常澆水，4 重複；乾旱逆境處理為進行斷水處理觀察 12-15 天，而後再恢復供水，4 重複；高鹽逆境處理為以 200 mM NaCl 處理觀察 12-15 天，恢復正常供水 7 天，各 4 重複；低溫逆境為培養於 4°C 處理觀察 12-15 天，恢復正常溫度 7 天。照相紀錄及計算存活率。

2.4 遠紅外線熱感應影像分析鹽逆境處理轉殖株條件

利用非破壞性遠紅外線熱影像技術 (Non-destructive infrared thermography) 檢測植物接受高鹽逆境處理下之生理反應，此原理係利用植物葉片蒸散速率與葉片溫度間之相關性，藉由檢測葉片溫度以了解與其高度相關之葉片蒸散速率的

氣孔導度 (Stomata conductance) (Costa *et al.*, 2013) 。

試驗材料為阿拉伯芥野生型 (Col-0) 、35S::*LfNCED3* 轉殖株 (OE2) 、*atnced3* 突變株 (N3) 與過度表現水稻 *OsADF2*, *OsADF11* 基因轉殖株，經過 4°C 春化作用後均勻灑於含有介質之 3 吋盆上，置於 22/18°C (日/夜溫) ，16/8 小時光照及黑暗周期之生長箱中，生長至 10 天後分別疏苗至 4 棵/盆，生長至 21 天大後先移置欲進行遠紅外線影像分析之中央研究院植微所生長室 (29°C ，55% RW) 馴化一天後進行高鹽逆境處理：以 200 mM NaCl 處理一天後，於恆溫生長室中以遠紅外線熱感應影像分析儀 (IRM-R300SR) 拍攝影像紀錄及分析葉片溫度。

四、 阿拉伯芥突變株及轉殖株之分子鑑定

1. 植物基因體組 DNA 萃取

取 50-100 mg 葉片放入 2 mL 微量離心管 (QSP) 中投入液態氮內急速低溫冷卻，接著以已消毒之鏢子放入一顆 5 mm 鋼珠，利用均質機以 1,200 rpm 震盪 10 秒將葉片磨成粉狀，若未完全磨碎可再重新放入液態氮後重新均質一次。接著加入 1 mL Urea extraction buffer 迅速震盪乳化，於室溫下靜置 5 分鐘。以 12,000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液 800 μ L 至新的 2 mL 微量離心管中，加入 400 μ L phenol (pH=8.0, Amresco)及 400 μ L Chloroform 迅速震盪乳化；以 12,000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液 500 μ L 至新的 1.5 mL 微量離心管中，加入等體積之 Isopropanol (Merck) 混勻，以 12,000 rpm 離心 10 分鐘，去除上清液並留下 DNA 沉澱物 (pellet) ；以 70% 酒精清洗 DNA 沉澱物，以 12,000 rpm 離心 7 分鐘，重複此步驟一次；去除酒精後將 DNA 沉澱物置於室溫下風乾，當 DNA 沉澱物呈現半透明糊狀時，加入 20 μ l 去離子水溶解 DNA 沉澱物後輕敲，於室溫下靜置 10 分鐘待 DNA 回溶於去離子水中，取 2 μ l DNA 溶液以光度計 NanoVue 定量。



2. DNA 洋菜瓊脂膠體電泳分析

配置 1% 濃度之洋菜瓊脂膠 (Agarose gel, 1 X TAE buffer) , 加熱將 Agarose 全數溶解後加入 ethidium bromide 並倒入鑄膠容器。在樣品中加入 6 x loading dye 混勻, 待膠體凝固後置於裝有 1 X TAE 緩衝液之電泳槽內, 將樣品注入膠片中, 以 100V 電壓電泳至色帶到膠體 2/3 位置後, 即可於 UV 箱內照相。

五、 阿拉伯芥突變株及轉殖株之基因表現分析

1. RNA 之抽取及製備

取 50-100 mg 樣品置入 2 mL 微量離心管中, 以液態氮冷卻樣品, 再放入預冷過之 5 mm 鋼珠, 同時將均質機之塑膠架也以液態氮中冷卻, 以 1,200 rpm 震盪 15 秒將樣品磨碎成粉狀, 接著加入 1 mL TRIZoL (Invitrogen) 並迅速混合均勻, 靜置於冰上 5 分鐘。於 4°C 下 13,000 rpm 離心 10 分鐘, 吸取 900 μ l 上清液加入新的 1.5 mL 微量離心管, 接著加入 240 μ l Chloroform (Merck) 震盪混勻, 靜置於冰上 10 分鐘後於 4°C 下 13,000 rpm 離心 10 分鐘。吸取 500 μ l 上清液至新的 1.5 mL 微量離心管, 加入同體積 Isopropanol, 上下搖晃均勻, 靜置於冰上 10 分鐘後於 4°C 下 13,000 rpm 離心 10 分鐘。沿著管壁吸取上清液丟棄, 加入 75% DEPC 處理之 EtOH 懸浮管底 RNA 沉澱物, 以 8000 rpm 離心五分鐘去上清液並重複上述步驟兩次, 去除上清液後將 RNA 沉澱物於室溫下風乾 5-10 分鐘。加入 30 μ l nuclear-free water 回溶 RNA, 保存於 -80°C。取 2 μ l RNA 溶液以光度計 NanoVue 定量。

2. RNase Free DNase I 處理

為防止 RNA 樣本受到殘留 genomic DNA 污染, 以 RNase Free DNase I 處理 RNA 樣本, 實驗步驟依照 Ambition TURBO DNase Free kit 使用手冊進行操作。取 10 μ g RNA 加入 40 μ l TURBO mix 混合均勻, 於 37°C incubator 內靜置 30 分鐘, 加入 5 μ l 已回溫之 Inactivation Reagent 室溫下 (25°C) 反應 5 分鐘, 一旦分層即

立刻混合。以 13,500 rpm 離心 5 分鐘，小心取上清液到新的微量離心管內。以光度計 NanoVue 定量，於冰-80°C 保存。



3. cDNA 合成之反轉錄反應

實驗步驟依照 RNA 反轉錄酵素 Invitrogen™ SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR kit 使用操作手冊，將 RNA 反轉錄成第一股互補 DNA (cDNA) 以進行後續基因表現分析。取 1µg RNA 樣本，加入 1 µl Oligo dT、2.5 µl 10 mM dNTP，並以 DEPC 處理之二次水將體積補至 28 ul，以 65°C 處理 5 分鐘，轉移至冰上 1 分鐘，接著加入 22 µl cDNA synthesis mix (5 µl 10X RT buffer、10 µl 25 mM MgCl₂、5 µl 0.1M DTT、1 µl RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor、1 µl SuperScript® III RT) 放入 PCR 機，程式設定 50°C 50 分鐘、85°C 5 分鐘，接著置於冰上加入 1 µl RNase H 於 37°C 處理 20 分鐘去除剩餘 RNA 後，保存於 -20°C 冰箱。

4. 反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)

取 1 µl cDNA、2.5 µl 10X PCR buffer、2 µl 10mM dNTP mix、0.5 µl 特定基因之 Forward (Fw) 及 Reverse (Rv) 引子對、0.5 µl DNA Taq polymerase，以去離子水補足體積至 25 µl。PCR 程式：94°C 處理五分鐘，94°C denature 30 秒/55°C annealing 30 秒/72°C extension 30 秒，重複 25 循環，再以 72°C 處理 7 分鐘，反應結束後保持於 4°C，保存於-20°C。

六、阿拉伯芥轉殖株之質粒構築及逆境耐受性測試

1. 35S::OsADF2 及 35S::OsADF11 質粒構築流程

本論文載體構築載體來源自於臺灣大學農業化學系洪傳揚老師實驗室提供之 pCYH8 及 pCAMBIA1320。以水稻 TNG67 的 cDNA library 為模板，以 PCR 進行

擴增取得 *OsADF2* 及 *OsADF11* 之 Open Reading Frame，使用 PCR 進行擴增取得，個別所使用的引子對如附錄五。建立載體構築步驟如下：(1) 將上述所得之 PCR 片段皆先接入 pGEM-T easy vector (Promega, USA) 轉入大腸桿菌中，經選殖與定序確定無誤。(2) 使用限制酶切進行 DNA 片段黏合反應。*35S::OsADF2* 及質粒構築之建立，是由比對 TIGR 序號 LOC_Os03g56790 之 coding sequence 為 438 bp，於其 5'端及 3'端設計 *KpnI* 切位引子 *OsADF2_KpnI_Fw*：

5'-GGTACCATGGCGTTCATGCGTTCCTCA-3'，*OsADF2_KpnI_Rv*：

5'-ACTAGTTTAATGAGCCCGCTCCCGGA-3'，以 PCR 擴增其片段，利用 PCR-clean up kit 回收其 DNA 片段，4°C 下進行黏接反應於 pGEM-T easy vector，並利用藍白篩篩選抽取質粒後定序，將 pTRA151 以 *KpnI* 切去 1.1 kb 之 *HPT* 基因，並以 16°C 黏接反應接上含有 *KpnI* 切位之 *OsADF2* 基因，由 *OsADF2_KpnI_Fw* 引子及 *tml-Rv* 引子增幅出片段確定接上方位。*35S::OsADF11* 及質粒構築之建立：比對 TIGR 序號 LOC_Os12g43340 之 coding sequence 為 438 bp，於其 5'端及 3'端設計 *BamHI* 切位引子 *OsADF11_BamHI_Fw*：5'-CGGGATCCATGGCATTTCGTCAGATCACG-3'，*OsADF11_BamHI_Rv*：5'-CGGGATCCTCAATGAGCACGCTCTCTAA-3'，以 PCR 擴增其片段，利用 PCR-clean up kit 回收其 DNA 片段，4°C 下進行黏接反應於 pGEM-T easy vector，並利用藍白篩篩選抽取質粒後定序，將 pTRA151 以 *BamHI* 切去 1.1 kb 之 *HPT* 基因，並以 16°C 黏接反應接上含有 *BamHI* 切位之 *OsADF11* 基因，由 *OsADF11_BamHI_Fw* 引子及 *tml-Rv* 引子增幅出片段確定接上方位。

2. 異位表現(heterologous expression)水稻基因之阿拉伯芥轉殖

將 *35S::OsADF2* 及 *35S::OsADF11* 質粒分別以農桿菌花序沾黏法(Floral dipping) (Clough *et al.*, 1998) 轉入野生型阿拉伯芥中(Col-0)，收取 T₁ 代轉殖株，以 Hygromycin (25 mg/L) 抗生素篩選至 T₂ 代計算分離比為 3:1 品系確認為單一 copy 之轉殖株，將存活植株之後代植株繼續栽種至成熟，收取種子並篩選至 T₃ 代作後

續實驗使用。貯存條件為保存於 25°C 恆溫恆濕環境，且須每半年重新種植並收取種子，以維持種子之新鮮度及活力。



3. 大腸桿菌轉型作用

3.1 大腸桿菌勝任細胞製備


本篇論文使用之勝任細胞菌株系為：*E. coli* XL1-Blue，以消毒過之玻棒將勝任細胞均勻塗抹於 LB 固態培養基（含 tetracycline 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ），在 37°C 下培養 12-16 小時，挑取單一菌落以 5 mL LB 液態培養基（含 tetracycline 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ）於 37°C 搖晃培養 12-16 小時，加於 500 mL LB 液態培養基（含 tetracycline 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ），於 37°C 培養至 OD₆₀₀ 值約 0.5-1.0。4°C 下以 8,000 rpm 離心菌液 15 分鐘，去除上清液於冰浴中加入 200 mL 無菌水懸浮菌體，重複兩次後加入 40 mL 已預冷的 10% glycerol 懸浮菌體，4°C 下以 8,000 rpm 離心菌液 5 分鐘後去除上清液，加入與菌體等量之 10% glycerol 懸浮菌體，以 40 μL 分裝於 1.5 微量離心管中，立即以液態氮冷卻保存於 -80°C 中。

3.2 質粒大腸桿菌轉型

本篇論文使用之大腸桿菌轉型實驗方法為 Heat Shock *E. coli* Transformation，取 2 μL 質粒 DNA 加入大腸桿菌勝任細胞混勻，置於冰上 15-20 分鐘，42°C 水浴 Heat shock 處理 1 分 30 秒，置於冰上 2 分鐘，接著在無菌操作台中加入 200 μL LB 液態培養基混勻，於 37°C 培養 15-20 分鐘，接著 4°C 下以 12,000 rpm 離心菌液 1 分鐘去除部分上清液，將剩餘之上清液與菌體混勻，塗於含有抗生素之 LB 固態培養基上，於 37°C 培養 12-16 小時。

3.3 檢測轉型後大腸桿菌質粒 colony PCR

先於微量離心管中配置 PCR 反應溶液（2.5 μL 10X PCR buffer、2 μL 10M NTP、




0.5 μl 各基因對應引子對 Forward 與 Reverse、0.5 μl DNA taq polymerase)，接著於轉型後之大腸桿菌之 LB 固態培養基上選取單一菌落，加入 PCR 反應溶液，加入去離子水將體積補至 25 μl 。進行 PCR 反應：95 $^{\circ}\text{C}$ 處理五分鐘，95 $^{\circ}\text{C}$ denature 30 秒/56 $^{\circ}\text{C}$ annealing 30 秒/72 $^{\circ}\text{C}$ extension 30 秒，重複 25 循環，再以 72 $^{\circ}\text{C}$ 處理 5 分鐘，反應結束後保持於 4 $^{\circ}\text{C}$ ，進行洋菜膠體電泳分析，並保存於-20 $^{\circ}\text{C}$ 。

3.4 大腸桿菌質粒 DNA 小量純化

本篇研究依照 GeneMark® Mini plasmid kit 操作手冊步驟：挑取單一菌落以 5 mL 含有抗生素之 LB 液態培養基於 37 $^{\circ}\text{C}$ 培養 12-16 小時。吸取 2 mL 菌液以 14,000 rpm 離心 1 分鐘，棄上清液並重複此步驟一次；接著加入 200 μl Solution I 與菌液均勻混勻，加入 200 μl Solution II 立即翻轉菌液使之轉變為澄清，接著再加入 200 μl Solution III 立即翻轉菌液，以 14,000 rpm 離心 5 分鐘。將 spin column 管柱放入 2 mL collection tube 中，將上清液轉移至其中，以 14,000 rpm 離心 1 分鐘，重複此步驟一次去除濾液。加入 700 μl Wash Solution，以 14,000 rpm 離心 1 分鐘，去除濾液，重複此步驟一次。以 14,000 rpm 離心 5 分鐘去除剩餘酒精。將 spin column 轉移至新的 1.5 mL 微量離心管，加入 30 μl 無菌水，室溫下靜置 5 分鐘待 DNA 回溶，以 14,000 rpm 離心 1 分鐘，將離心後的 DNA 片段溶液保存於-20 $^{\circ}\text{C}$ 中。

4. DNA 片段的製備與回收

利用對應之限制酵素於載體上切取所求目標片段或以 PCR 擴增出特定片段，進行電泳確認條帶，並於 UV 燈下切取含有所需之 DNA 片段之瓊脂膠體置於 1.5 mL 微量離心。本篇研究依據 GeneMark® Gel Elution kit 操作手冊進行實驗步驟：將裝有目標 DNA 膠體之 1.5 mL 微量離心管秤重，加入等體積之 Binding Solution，以 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加熱 10 分鐘，反應過程需上下翻轉至膠體完全溶解；接著將 spin column 管柱放入 2 mL collection tube 中，將反應液轉移至其中，以 13,000 rpm 離心 1



分鐘，去除 collection tube 中濾液，加入 500 μ l Binding Solution 以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，去除 collection tube 中濾液；加入 700 μ l Washing Solution，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，去除 collection tube 中濾液，重複此步驟一次；再以 13,000 rpm 離心 7 分鐘去除殘餘酒精；將 spin column 轉移至新的 1.5 mL 微量離心管中，加入 20 μ l 去離子水，靜置 5 分鐘後以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，將離心後的 DNA 片段溶液保存於-20 $^{\circ}$ C 中。

5. 阿拉伯芥基因轉殖

5.1 植物材料預備

野生型阿拉伯芥種子(Col-0)於 4 $^{\circ}$ C 處理兩天進行春化作用，播種於裝有基培養土之三寸盆，種於 22/18 $^{\circ}$ C (日/夜溫)，16/8 (光照/黑暗) 生長箱中生長，10 天後進行疏苗，每盆留 4-6 株保持植株間距，待 3-4 周開始抽苔時摘心，1 周後進行阿拉伯芥農桿菌轉殖，進行阿拉伯芥農桿菌轉殖前土壤必須使之吸滿水分以免土壤吸收多於菌液而導致植株感染死亡。

5.2 農桿菌轉型

5.2.1 農桿菌勝任細胞製備

本篇研究使用之農桿菌菌系：GV3101，於 LB 液態培養基 (含 Gentamycin 50 μ l/mL) 在 28 $^{\circ}$ C 培養兩天，取單一菌落培養於 5mL LB 液態培養基 (含 Gentamycin 50 μ l/mL) 28 $^{\circ}$ C 震盪培養兩天，轉移至 50 mL LB 液態培養基 (含 Gentamycin 50 μ l/mL) 於 28 $^{\circ}$ C 培養至 OD₆₀₀ 值約 0.5-1.0。4 $^{\circ}$ C 下以 4,500 rpm 離心菌液 5 分鐘，去除上清液加入 10 mL 已預冷的 10% glycerol 懸浮菌體，4 $^{\circ}$ C 下以 4,500 rpm 離心菌液 5 分鐘後去除上清液，加入與菌體等量之 10% glycerol 懸浮菌體，以 40 μ l 分裝於 1.5 微量離心管中，立即以液態氮冷卻保存於-80 $^{\circ}$ C 中。



5.2.2 質粒農桿菌轉型

取 1 μl 質粒 DNA 加入農桿菌勝任細胞混勻，置於冰上 5 分鐘，加入預冷之電穿孔電導管 (cuvette, Bio-Rad[®])，放入電穿孔儀器 (Bio-Rad[®] micropluser) 之電槽中，選擇 AGO1 後按開始進行電導，電導後將電導管置於冰浴中，接著在無菌操作台中加入 1 mL LB 液態培養基混勻，轉移至 1.5 mL 微量離心管中，於 28 $^{\circ}\text{C}$ 培養 30 分鐘，接著 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 8,000 rpm 離心菌液 1 分鐘去除部分上清液，將剩餘之上清液與菌體混勻，塗於含有抗生素之 LB 固態培養基上，於 28 $^{\circ}\text{C}$ 培養兩天。

5.2.3 檢測轉型後之農桿菌質粒 colony PCR

先於微量離心管中配置 PCR 反應溶液(2.5 μl 10 X PCR buffer、2 μl 10M NTP、0.5 μl 各基因對應引子對 Forward 與 Reverse、0.5 μl DNA taq polymerase)，接著於轉型後之農桿菌之 LB 固態培養基上選取單一菌落，加入 PCR 反應溶液，加入去離子水將體積補至 25 μl 。進行 PCR 反應：95 $^{\circ}\text{C}$ 處理五分鐘，95 $^{\circ}\text{C}$ denature 30 秒 /56 $^{\circ}\text{C}$ annealing 30 秒/72 $^{\circ}\text{C}$ extension 30 秒，重複 25 循環，再以 72 $^{\circ}\text{C}$ 處理 5 分鐘，反應結束後保持於 4 $^{\circ}\text{C}$ ，進行洋菜膠體電泳分析，並保存於-20 $^{\circ}\text{C}$ 。

5.2.4 阿拉伯芥轉殖

配製農桿菌轉殖浸潤液 (infiltration medium) (100 mL/construct)，將含有轉殖質粒之 GV3101 農桿菌接種至 5 mL LB 液態培養基 (含 Gentamycin 50 $\mu\text{l}/\text{mL}$)，於 28 $^{\circ}\text{C}$ 培養 2 天，將菌液移至 100 mL LB 液態培養基 (含 Gentamycin 50 $\mu\text{l}/\text{mL}$) 於 28 $^{\circ}\text{C}$ 培養至 OD₆₀₀ 值約 0.5-1.0，於 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 4,500 rpm 離心菌液 10 分鐘，去上清液加入適量體積之 Infiltration medium，將菌體懸浮至 OD₆₀₀ 達 0.5。欲轉殖之阿拉伯芥野生型在進行花序沾黏法 (Floral dipping) 前，應使之栽種介質吸滿水分，並且移除已結之果莢及已開之花序，將阿拉伯芥花序倒扣於含有轉殖農桿菌之浸潤液中 5 分鐘，接著將整株以塑膠袋包覆並移至生長箱中須注意通風，12-24 小時後移除塑膠袋待植株成熟後收取種子。



6. 阿拉伯芥轉殖株篩選

6.1 抗生素篩選轉殖株

將轉殖後 T₁ 代阿拉伯芥種子消毒後撒播於含有抗生素 Hygromycin B (25 mg/L) 的 1/2 MS medium 上，置於 22/18°C (日/夜溫)，16/8 小時光照 (光照強度 120-150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$) 及黑暗周期之生長箱中，約一周後即可篩選到具有抵抗抗生素能力之植株，即為轉殖株；待轉殖株長出兩片真葉後移植至栽培介質，於 22/18°C (日/夜溫)，16/8 小時光照 (光照強度 120-150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$) 及黑暗周期之生長箱中培養，植株抽苔後可摘除第一個花序，以利後續收取較多種子。

七、 *OsADF* 基因家族之 GFP 融合蛋白之次細胞位置分析

本論文載體構築來源自於臺灣大學農業化學系洪傳揚老師實驗室提供之 pCYH8 及 pCAMBIA1320，以及由博士後研究員陳鴻吉學長提供之 pHCC1300::*GFP* 為 GFP 擴增之膜板。

1. Ub::*OsADFs*-GFP 質粒構築流程

本篇研究以水稻 TNG67 的 cDNA library 為膜板，以 PCR 進行擴增取得 *OsADF1*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11 之 Open Reading Frame，同時 GFP open reading frame 則以 pHCC1300::*GFP* 質粒為膜板，使用 PCR 進行擴增取得，各別所使用的引子對如表三。進行載體構築之步驟如下：(1) 將上述所得 PCR 片段先接入 pGEM-T easy vector (Promega, USA) 轉入大腸桿菌中，經選殖與定序確定無誤。(2) 使用限制酶酶切進行 DNA 片段黏合反應。先將水稻 *OsADFs* 及 GFP 利用 *SmaI*、*HindIII* 及 *AvrII* 切位進行酶切，利用中間載體 pHCC1300 黏合 *OsADFs* 及 GFP，再次定序確認序列正確。pCYH8 質粒特性可供目標基因作戰時性表現之分析，具有玉米 Ubiquitin 啟動子，分別將水稻 *OsADF1*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11 與 *GFP* 基因片段以 *SmaI* 和 *SpeI* 切位接合入 pCYH8 之 *SmaI* 及 *SpeI* 限制酶切位，接著再以 Heat Shock 的方式導入大腸桿菌，大量培養後抽取質體 DNA。



2. 水稻材料預備

抽取原生質體的樣品是來自十天大之 TNG67 水稻之葉鞘。將 TNG67 水稻種子去殼，於無菌操作台中加入 70% 酒精震盪 7 分鐘，去除酒精後加入 1-2% NaOCl (含 0.05% Tween-20) 震盪 10 分鐘，去除 NaOCl，以無菌水震盪清洗種子至少 4-5 次，直到不再出現泡沫。以鏢子將水稻種子整齊排列於 8% Agar 之 1/2 MS (SIGMA) 培養基，在抽取原生質體的前兩天避光處理，以避免水稻葉綠體數量太多導致不易觀察。

3. 抽取水稻原生質體

準備 Enzyme solution (1.5% Onozuka RS, 0.75% Macerozyme R10, 0.8 M mannitol, 0.1 M MES pH=5.7, 1 M CaCl₂, 0.1% BSA)，將十天大的水稻之葉鞘於酶切溶液中切碎質 0.5-1 mm，抽真空 15 到 30 分鐘使酵素液服貼於葉鞘碎屑，於黑暗中 28°C 以 40 rpm 震盪 4 小時，最後一分鐘以 80 rpm 震盪。以 W5 solution (3 M NaCl, 1 M CaCl₂, 1 M KCl, 2 mM MES pH=5.7) 潤洗 nylon mesh，將含有水稻葉鞘碎屑之酶切溶液過濾至 50 mL falcon tube，於 4°C 下以 250 xg 離心 7 分鐘。去除上清液，以 W5 懸浮原生質體，再於 4°C 下以 250 xg 離心 7 分鐘，去除上清液加入 2-3 mL W5 懸浮原生質體，利用血球計數器於顯微鏡下計算原生質體濃度，於 4°C 下以 250 rpm 離心 7 分鐘，去除上清液，以 MMg buffer (0.8 M mannitol, 15 mM CaCl₂, 4 mM MES pH=5.7) 調整濃度至 1×10^6 protoplast/mL。

4. 聚乙二醇(PEG) 轉殖水稻原生質體

在新的微量離心管中加入 10 μ l DNA (含有 10-20 μ g DNA)，加入 200 μ l 原生質體溶液混勻，加入等體積 (210 μ l) PEG solution (PEG 4000) (40% w/v) 輕敲管壁混勻，於黑暗室溫下靜置 30 分鐘，加入 1 mL W5 混勻，於 4°C 下以 250 xg 離心 7

分鐘，去除上清液加入 1mL Incubation solution (0.8M mannitol, 4mM MES pH=5.7, 4mM KCl)混勻，在培養容器上均勻塗抹 0.1% BSA，於 26°C 黑暗中培養 16 小時。



5. 共軛焦顯微鏡 (confocal microscope) 觀察螢光蛋白表現

在進行觀察螢光蛋白表現前需吸取少量 (1-2 μ l) 已轉殖之原生質體溶液於載玻片上，蓋上蓋玻片後以透明指甲油封住蓋玻片及載玻片之間隙，小心勿誤壓到原生質體溶液以免原生質體破裂。本次進行共軛焦顯微鏡觀察螢光蛋白表現使用之儀器為使用中研院農業生物科技研究中心之共軛焦顯微鏡室之倒立共軛焦顯微鏡 (Zeiss LSM 510 META NLO DuoScan) 以及台大生物資源暨農學院共同儀器中心之共軛焦顯微鏡 (Leica TCS SP5 II)。共軛焦顯微鏡之開機步驟：依序打開總電源、冷卻系統、雷射之開關，接著打開螢光電源及電腦主機與螢幕。在蓋玻片上塗抹少量乾油以便油鏡觀察。觀察樣品之步驟為於可見光下在視野內找到樣品並調整焦距，利用 configuration 切換各螢光濾片阻與穿透光設定，選取對應實驗之螢光雷射波長 (本實驗之螢光蛋白為 GFP，遂調整波長為 500 nm)，確認確實有螢光蛋白表現之樣品位置後，進入影像擷取模式 (中研院:LSM, 台大共儀:Leica)，於預覽影像下調整掃描參數值 (zoom)及視野下之掃描區域，進行正式掃圖，即可獲得欲觀察之螢光蛋白表現位置圖。全部樣品觀察結束後輸出圖片檔，需利用空白光碟片進行燒錄。

第四章 結果



一、*OsADF2* 及 *OsADF11* 基因於非生物逆境下之基因功能分析

1. 異位表現水稻 *OsADF2* 及 *OsADF11* 基因之阿拉伯芥轉殖株分子鑑定

將各自以 35S 啟動子驅動水稻 *OsADF2*、*OsADF11* 基因之質粒（附圖三），藉由農桿菌之花序沾黏法（*Agrobacterium*-mediated floral dipping），將表現載體各自轉入野生型阿拉伯芥（Col-0）中，並將種子持續以 Hygromycin B 抗生素（25 mg/L）篩選至 T₃ 代同型結合種子後，進行轉殖株之分子鑑定。為確定水稻 *OsADF2* 及 *OsADF11* 基因各自確實轉入阿拉伯芥中，以 PCR 技術偵測 T₃ 代 35S::*OsADF2*、35S::*OsADF11* 阿拉伯芥轉殖株之 *HPT* 抗性基因（使用之引子序列如附錄五），由洋菜瓊脂膠體電泳結果顯示轉殖株中皆有 *HPT* 抗性基因之條帶，確認其為轉殖株（data not shown）。接著為了確定水稻 *OsADF2* 及 *OsADF11* 確實在各阿拉伯芥轉殖株中大量表現，以 RT-PCR（Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction）技術進行基因表現分析，結果顯示 35S::*OsADF2* 轉殖株中確實有水稻 *OsADF2* 大量表現、35S::*OsADF11* 轉殖株中確實有 *OsADF11* 大量表現，野生型阿拉伯芥則沒有 *OsADF2* 或 *OsADF11* 之基因表現（圖一）。

2. 異位表現水稻 *OsADF2* 及 *OsADF11* 基因之阿拉伯芥轉殖株外表型觀察

2.1 水稻 *OsADF2* 及 *OsADF11* 基因影響阿拉伯芥植株大小

在正常栽種的情況下 35S::*OsADF2* 轉殖阿拉伯芥轉殖株及 35S::*OsADF11* 轉殖株阿拉伯芥與野生型（Col-0）阿拉伯芥在生長發育形態上沒有顯著性的差異，而以 Image J 程式測量各植株所有葉片面積總和進行統計分析比較，由結果顯示 35S::*OsADF2* 轉殖株及 35S::*OsADF11* 轉殖株的葉面積大小和野生型阿拉伯芥相比較大（圖一）。



2.2 水稻 *OsADF2* 及 *OsADF11* 基因提早植株开花时间

野生型的阿拉伯芥发芽后约一个月会分化出花芽并且抽苔 (bolting)，接著进入生殖生长期，而观察 *35S::OsADF2* 转植株及 *35S::OsADF11* 转植株之抽苔时间也较野生型 Col-0 为早，其中以 *OsADF2* 之转植株提早 3-4 天抽苔，而 *OsADF11* 则是此趋势较不明显，但仍有提早 2-3 天较野生型为早抽苔的现象 (图二 (A)(B))，而在开花时间观察上察 *35S::OsADF2* 转植株及 *35S::OsADF11* 转植株显示提早 2-3 三天，然其之 rosette leaf number (RLN) 上无明显差异 (data not shown)。

3. 水稻 *OsADF2* 基因之基因功能性分析

3.1 阿拉伯芥之 *35S::OsADF2* 转植株之发芽率测定

为了瞭解异位性表达水稻 *OsADF2* 于阿拉伯芥中是否会影响其发芽率，遂将同时采收之转植株种子及野生型 Col-0 种子同时种植于同一盘培养基 (1% sucrose, 8 g/L Agar 1/2 MS) 中，并且统计其发芽率及发芽势，由结果中显示 *35S::OsADF2* 之阿拉伯芥转植株之发芽势在一般环境下与野生型 Col-0 无异 (图三)。

3.2 *35S::OsADF2* 转植株于非生物逆境下之观察

3.2.1 发芽率观察

为分析 *35S::OsADF2* 转植株是否影响到高盐逆境下的发芽率及发芽势，使用不同浓度之 NaCl (100 mM、150 mM、200mM) 进行测试，其中以 150 mM NaCl 之处理具有最明显的表现差异，遂利用此浓度进行发芽率观察。

由结果中显示培养于 150 mM NaCl 1/2 MS 培养基中之 *35S::OsADF2* 转植株之发芽速率较野生型 Col-0 为快 (图三)，然而最终发芽率转植株与野生型皆较一般环境下培养降低。



3.2.2 根長分析

由 Wang 等人之研究中指出阿拉伯芥之根長受到高鹽逆境影響而抑制其生長，並且若使用肌動蛋白聚合穩定劑會恢復其根部生長勢，而添加肌動蛋白聚合抑制劑則更加劇了阿拉伯芥根部受到之高鹽逆境迫害 (Wang *et al.*, 2008)。因此對 5 天大及 10 天大之阿拉伯芥植株進行鹽份逆境處理觀察其根長生長之變化。將培養於一般環境培養基之野生型與 35S::*OsADF2* 轉殖株培養至 5 天、10 天後移植至含有 150 mM NaCl + 1/2 MS 培養基 (控制組為移植至 1/2 MS 培養基)，觀察移植後 4 天之根部生長趨勢以及存活率。由結果顯示在正常環境下之野生型 Col-0 及 35S::*OsADF2* 轉殖株根長無顯著差異 (圖三)，接著以正常生長環境下之根長作為標準化基準，觀察於 150 mM NaCl 鹽逆境處理下之根部生長長度差異，結果顯示 35S::*OsADF2* 轉殖株之根長顯著長於野生型 Col-0 (圖三)，且移植 4 天後之存活率也顯著較高 (圖三)。

3.2.3 成株觀察

為了解水稻 *OsADF2* 在不同逆境下在植物體內所參與的影響以及生理反應，此以不同之非生物逆境處理 21 天大之 35S::*OsADF2* 轉殖株阿拉伯芥，觀察其在逆境下的反應以及回復後的生理表現。

3.2.3.1. 乾旱逆境下 35S::*OsADF2* 轉殖株之反應觀察

對 21 天大之野生型阿拉伯芥 (Col-0) 以及 35S::*OsADF2* 轉殖株阿拉伯芥進行斷水處理，斷水處理 7 天後野生型已開始出現萎凋以及花青素累積之現象，然而在 35S::*OsADF2* 轉殖株阿拉伯芥則是仍維持正常生長並且無花青素累積。接著以乾旱處理 5 天 (累積停止給水 12 天) 後作為實驗控制組之 N3 突變株已經完全死亡，野生型則是葉片捲曲程度加劇萎凋情形更加嚴重，而 35S::*OsADF2* 轉殖株此時才開始出現萎凋之現象，然而其葉片之萎凋程度仍小於野生型。接著進行復水實驗，

復水後一天 35S::*OsADF2* 轉植株葉片之捲曲及花青素累積即有稍微回復之現象，接著持續恢復 5 天後野生型 Col-0 阿拉伯芥有些微恢復之現象(葉片萎縮程度減少，但仍有皺縮之情形)，作為正向調控組之 *OE2* 則是葉片萎凋程度恢復幅度大，除枯黃之葉片外其他葉片回復青綠色及減少皺縮情形，而 35S::*OsADF2* 轉植株則是幾乎完全回復，葉片呈現青綠色且無皺縮之情形 (圖五)。

3.2.3.2. 高鹽逆境下 35S::*OsADF2* 轉植株之反應觀察

以 200 mM NaCl 處理 21 天大之野生型阿拉伯芥 (Col-0) 以及 35S::*OsADF2* 轉植株阿拉伯芥，並連續觀察 12-15 天，由結果顯示以 200 mM NaCl 處理 14 天後野生型 Col-0 出現葉片葉緣黃化之葉綠素降解現象，作為正向調控組之 *OE2* 則是仍維持青綠色，負向調控組之 *N3* 則是呈現更嚴重之葉綠素降解且葉片出現皺縮現象，而 35S::*OsADF2* 轉植株則是有些許葉片出現葉綠體降解之現象，且在莖及葉中有花青素累積，而葉片表面有些微臘質狀態，由轉植株之葉綠體降解現象較野生型為輕微，且在後續繼續以鹽份處理觀察長時間之鹽份逆境對植物之影響，顯示野生型及控制組之葉片呈現軟嫩現象，而轉植株之葉片則具有較剛硬之觸感，推測 *OsADF2* 應在植物面臨鹽份逆境時有參與其生理反應而增加其鹽份逆境耐受性 (圖六)。

3.2.3.3. 低溫逆境下 35S::*OsADF2* 轉植株之反應觀察

將 21 天大之野生型阿拉伯芥 (Col-0) 以及 35S::*OsADF2* 轉植株阿拉伯芥轉移至 4°C 低溫生長箱。低溫處理 7 天後觀察其外表型，結果中發現無論是野生型 (Col-0) 或是 35S::*OsADF2* 轉植株阿拉伯芥皆有出現受到低溫而抑制生長，並且發生延緩其抽苔、開花之時間之現象，同時也有同樣出現較發達的茸毛 (trichome)，持續低溫處理 14 天後，試驗組之阿拉伯芥間無明顯差異，與對照組 (22°C/18°C) 阿拉伯芥相比皆有延緩發育現象，5 週後仍尚未進入生殖生長期 (圖七)。

3.2.4 35S::OsADF2 過度表現轉植株於逆境下之遠紅外線熱感應影像分析

當植物面臨高鹽逆境時，會藉由調控氣孔之開闔以控制體內之水分含量以維持植物體之滲透壓，以及後續之生理反應，當植物氣孔關閉時葉溫會升高，而氣孔打開時則是葉溫會下降，因此利用非破壞性遠紅外線熱感應影像分析來觀察葉溫以了解 35S::OsADF2 轉植株在高鹽逆境下之反應，其中顏色偏向藍色代表溫度較低，而偏向紅色則是溫度較高。為了探討鹽份逆境對於植物蒸散作用以及氣孔開合的影響，遂以 200 mM NaCl 處理 3 週大之阿拉伯芥野生型 (Col-0)、35S::LjNCED3 (OE2)、atnced3 (N3)、35S::OsADF2 轉植株 24 小時，控制組則是澆以一般自來水，隔天在同間生長室內進行拍攝，以遠紅外線熱感應儀觀察葉溫。由結果顯示在一般環境下 35S::OsADF2 轉植株與野生型之葉溫無明顯差距 (圖十一 (A))，而在以 200 mM NaCl 處理 24 小時之 35S::OsADF2 轉植株葉溫則是較控制組為高，但與野生型無明顯差異 (圖十一 (B))。

4. OsADF11 基因之基因功能性分析

4.1 阿拉伯芥之 35S::OsADF11 過度表現轉植株之發芽率

為了瞭解異位性表達水稻 OsADF11 於阿拉伯芥中是否會影響到其發芽率，遂將同時採收之轉植株種子及野生型 Col-0 種子同時種植於同一盤培養基 (1% sucrose, 8 g/L Agar 1/2 MS) 中並且統計其發芽率及發芽勢，由結果中顯示 35S::OsADF11 之阿拉伯芥轉植株之發芽勢在一般環境下與野生型 Col-0 無異 (圖四)。

4.2 35S::OsADF11 轉植株於非生物逆境下之觀察

4.2.1 發芽率分析

為分析 35S::OsADF11 轉植株是否影響到高鹽逆境下的發芽率及發芽勢，使用不同濃度之 NaCl (100 mM、150 mM、200 mM) 進行測試，其中以 150 mM NaCl

之處理具有最明顯的表現差異，遂利用此濃度進行發芽率及發芽勢分析。

由結果中顯示培養於 150 mM NaCl 1/2 MS 培養基中之 35S::*OsADF11* 轉殖株之發芽速率較野生型 Col-0 為快 (圖四)，然而最終發芽率轉殖株與野生型皆較一般環境下培養降低。

4.2.2 根長分析

由 Wang 等人之研究中指出阿拉伯芥之根長受到高鹽逆境影響而抑制其生長，並且若使用肌動蛋白聚合穩定劑會恢復其根部生長勢，而添加肌動蛋白聚合抑制劑則更加劇了阿拉伯芥根部受到之高鹽逆境迫害 (Wang *et al.*, 2008)。因此對 5 天大及 10 天大之阿拉伯芥植株進行鹽份逆境處理觀察其根常生長之變化。將培養於一般環境培養基之野生型與 35S::*OsADF11* 轉殖株培養至 5 天、10 天後移植至含有 150 mM NaCl + 1/2 MS 培養基 (控制組為移植至 1/2 MS 培養基)，觀察移植後 4 天之根部生長趨勢以及存活率。由結果顯示在正常環境下之野生型 Col-0 及 35S::*OsADF11* 轉殖株根長無顯著差異 (圖四)，接著以正常生長環境下之根長作為標準化基準，觀察於 150 mM NaCl 鹽逆境處理下之根部生長長度差異，結果顯示 35S::*OsADF11* 轉殖株之根長顯著長於野生型 Col-0 (圖四)，且移植 4 天後之存活率也顯著較高 (圖四)。

4.2.3 成株觀察

為了解水稻 *OsADF11* 在不同逆境下在植物體內所參與的影響以及生理反應，此以不同之非生物逆境處理 21 天大之 35S::*OsADF11* 轉殖株阿拉伯芥，觀察其在逆境下的反應以及回復後的生理表現。



4.2.3.1. 乾旱逆境下 *35S::OsADF11* 轉殖株之反應觀察

對 21 天大之野生型阿拉伯芥 (Col-0) 以及 *35S::OsADF11* 轉殖株阿拉伯芥進行斷水處理，斷水處理 7 天後野生型已開始出現萎凋以及花青素累積之現象，而在 *35S::OsADF11* 轉殖株阿拉伯芥則是仍維持正常生長並且無花青素累積，繼續以乾旱處理 5 天後作為實驗控制組之 *N3* 突變株已經完全死亡，野生型則是葉片捲曲程度加劇萎凋情形更加嚴重，而 *35S::OsADF11* 轉殖株仍維持正常生長，僅葉片出現些微捲曲及少量花青素累積，接著進行復水實驗後一天 *35S::OsADF11* 轉殖株葉片之捲曲及葉片花青素累積即有回復之現象，接著持續復 5 天後野生型 Col-0 阿拉伯芥有些微恢復之現象（葉片萎縮程度減少，但仍有皺縮之情形），作為正向調控組之 *OE2* 則是葉片萎凋程度恢復幅度大，除枯黃之葉片外其他葉片回復青綠色及減少皺縮情形，而 *35S::OsADF11* 轉殖株則是幾乎完全回復，葉片呈現青綠色且完全舒展無皺縮現象。由轉殖株之葉綠體降解現象較野生型為輕微，且在後續繼續以鹽份處理觀察長時間之鹽份逆境對植物之影響，顯示野生型及控制組之葉片呈現軟嫩現象，而轉殖株之葉片則具有較剛硬之觸感，推測 *OsADF11* 應在植物面臨鹽份逆境時有參與其生理反應而增加其鹽份逆境耐受性（圖八）。

4.2.3.2. 高鹽逆境下 *35S::OsADF11* 轉殖株之反應觀察

以 200 mM NaCl 處理 21 天大之野生型阿拉伯芥 (Col-0) 以及 *35S::OsADF11* 轉殖株阿拉伯芥，並連續觀察 12-15 天，由結果顯示以 200 mM NaCl 處理 14 天後野生型 Col-0 出現葉片葉緣黃化之葉綠素降解現象，作為正向調控組之 *OE2* 則是仍維持青綠色，負向調控組之 *N3* 則是呈現更嚴重之葉綠素降解且葉片出現皺縮現象，而 *35S::OsADF11* 轉殖株則是於老葉及子葉有些許葉片發生葉綠體降解之葉片黃化，且在莖及葉中有花青素累積現象，而葉片表面有些微臘質狀態（圖九）。



4.2.3.3. 低溫逆境下 35S::*OsADF11* 轉植株之反應觀察

將 21 天大之野生型阿拉伯芥 (*Col-0*) 以及 35S::*OsADF11* 轉植株阿拉伯芥轉移至 4°C 低溫生長箱。低溫處理 7 天後觀察其外表型，結果中發現無論是野生型 (*Col-0*) 或是 35S::*OsADF11* 轉植株阿拉伯芥皆有出現受到低溫而抑制生長，其中 35S::*OsADF11* 轉植株阿拉伯芥之受到抑制生長較明顯，並且皆發生延緩其抽苔、開花時間之現象，同時也有同樣出現較發達的茸毛 (*trichome*)，持續低溫處理 14 天後，試驗組之阿拉伯芥間無明顯差異，僅 35S::*OsADF11* 轉植株於處理 7 天後子葉部分出現受損情形，然而在其他葉片仍維持正常表現無其他明顯反應，推斷可能子葉之組織較脆弱而出現受傷情形。持續處理 14 天後子葉呈現葉緣黃化且皺縮，與對照組 (22°C/18°C) 阿拉伯芥相比皆有延緩發育現象，5 週後仍尚未進入生殖生長期 (圖十)。

4.2.4 35S::*OsADF11* 過度表現轉植株於逆境下之遠紅外線熱感應影像分析

當植物面臨高鹽逆境時，會藉由調控氣孔之開闔以控制體內之水分含量以維持植物體之滲透壓，以及後續之生理反應，當植物氣孔關閉時葉溫會升高，而氣孔打開時則是葉溫會下降，因此利用非破壞性遠紅外線熱感應影像分析來觀察葉溫以了解 35S::*OsADF11* 轉植株在高鹽逆境下之反應。為了探討鹽份逆境對於植物蒸散作用以及氣孔開合的影響，遂以 200 mM NaCl 處理 3 周大之阿拉伯芥野生型 (*Col-0*)、35S::*LfNCED3* (*OE2*)、*atnced3* (*N3*)、35S::*OsADF11* 轉植株 24 小時，控制組則是澆以一般自來水，隔天在同間生長室內進行拍攝，以遠紅外線熱感應儀觀察葉溫，其中顏色偏向藍色代表溫度較低，而偏向紅色則是溫度較高。由結果顯示在一般環境下 35S::*OsADF11* 轉植株與野生型之葉溫無明顯差距 (圖十一 (C))，而以 200 mM NaCl 處理 24 小時後，35S::*OsADF11* 轉植株之葉溫則是較野生型為高 (圖十一 (D))。

二、水稻肌動蛋白去聚合因子家族基因之 GFP 融合蛋白於水稻原生質體之次細胞定位

本篇論文係利用 PEG 轉殖 (PEG transfection method) 水稻原生質體系統研究水稻 *OsADF* 家族基因之次細胞定位，原理為利用高滲透壓下水稻原生質體細胞之胞飲作用將外界之欲轉殖入之質粒吸入細胞內，而此含有目標基因之質粒由於本身具有啟動子而得以於細胞之中表達並產生目標蛋白質與標記蛋白 (如 GFP、YFP 等) 之融合蛋白，再利用特定波長之雷射激發其螢光表現並使用共軛焦顯微鏡觀察其螢光表現以了解其表現部位。本實驗於 CYH8 載體上建立 *OsADF1*、*OsADF2*、*OsADF3*、*OsADF4*、*OsADF5*、*OsADF6*、*OsADF7*、*OsADF10*、*OsADF11* 與 GFP 之融合蛋白，以玉米 ubiquitin promoter 作為啟動子，觀察此些融合蛋白之定位並分析基因表現部位。

由結果顯示對照組之 CYH8-*Ub::GFP* 表現於水稻原生質體之細胞質及核內，而 *Ub::OsADF1-GFP*、*Ub::OsADF2-GFP*、*Ub::OsADF4-GFP*、*Ub::OsADF5-GFP*、*Ub::OsADF6-GFP* 融合蛋白皆表現於水稻原生質體的葉綠體中，而 *Ub::OsADF2-GFP*、*Ub::OsADF3-GFP*、*Ub::OsADF11-GFP* 融合蛋白則是細胞質與細胞核內 (圖十二)。

第五章 討論



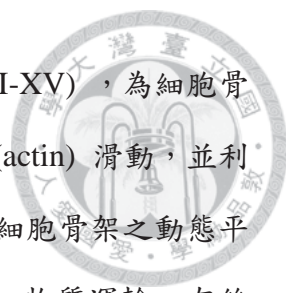
植物細胞骨架之動態平衡是影響植物細胞是否能維持正常生理功能之調控因子之一，且細胞骨架與細胞內訊息傳遞分子（如鈣離子）之訊息傳遞息息相關（附錄四），而細胞骨架之動態平衡受到肌動蛋白去聚合因子（ADF）參與調控。目前對於肌動蛋白去聚合因子的了解大多是在參與植物之生長發育以及生物逆境上的研究，在水稻 *ADF* 基因之研究以及其在非生物逆境下對植物的反應機制以及耐受性了解甚少，因此本篇論文為探討水稻之 *ADF* 對於植物面臨非生物逆境下的反應及與植物之逆境耐受性之關聯，藉由利用研究過度表現水稻 *OsADF2* 及 *OsADF11* 基因異位表達於阿拉伯芥中，觀察其非生物逆境下的反應，以推論其可能參與之生理功能。

首先先對於經由農桿菌花序沾黏法 (Agrobacterial-mediated floral dipping) 產生之 T_2 代 *35S::OsADF2* 及 *35S::OsADF11* 轉殖株進行簡易之篩選，去除在一般環境下栽培觀察具有副作用 (side effect) 之品系，如植株形態、生長趨勢明顯與其他品系不同者，接著進行逆境之初篩，挑選出於逆境下具有相同反應之品系。在本篇論文中 *35S::OsADF2* 轉殖株最後所篩選之品系為：*OsADF2-3*、*OsADF2-4*、*OsADF2-6*，而 *35S::OsADF11* 轉殖株最後所篩選之品系為：*OsADF11-1*、*OsADF11-2*、*OsADF11-3*。

一、 探討水稻 *OsADF2* 及 *OsADF11* 基因與植物生長發育之關係


1. *OsADF2* 與 *OsADF11* 可能參與植物之生長發育及開花時間

由外表型分析顯示 *OsADF2* 及 *OsADF11* 可增加轉殖植物之生物量，在葉片的葉面積上顯著較野生型為大，推測其可能原因是過度表現水稻 *OsADF2* 之功能可能造成細胞質流 (Cytoplasmic streaming) 的變化及改變。細胞質流是從藻類到被子植物之細胞中廣泛存在之一種細胞主動運輸，其流動速度在各物種間各有所異 (1 – 70 $\mu\text{m/s}$)，此細胞質流的速度直接受到肌球蛋白



(myosin) 之調控，肌球蛋白目前已知有 15 種類型 (myosin I-XV)，為細胞骨架之分子馬達，為一種多功能蛋白質，藉由沿著肌動蛋白 (actin) 滑動，並利用與 ATP 結合產生機械能而產生極性運動，與 ADF 同樣為細胞骨架之動態平衡之調控因子，也參與植物細胞之細胞質流動、胞器運移、物質運輸、有絲分裂、胞質分裂及細胞頂端生長提供動力，也參與細胞生命活動不同機制之調控因子，如細胞間訊號傳遞、向性生長及細胞形狀等(Shimmen and Yokota, 2004; Yamamoto, 2008)。阿拉伯芥之肌球蛋白 XI 群中具有 13 種肌球蛋白 (Reddy, 2001)，在前人研究中藉由剔除此些肌球蛋白功能之突變中發現會影響植株生長，如細胞大小下降以及延遲開花，皆顯示細胞質流影響植物之生長發育 (Peremyslov et al., 2008, 2010, 2012; Prokhnevsky et al., 2008; Ueda et al., 2010)。2013 年 Tominaga 等人利用來自於藻類 (*Chara corallina*) 之快速肌球蛋白(High-speed myosin XI-2/xi-2)及人類 (*Homo sapiens*) 之較慢速肌球蛋白(Low-speed myosin XI-2/xi-2)替代阿拉伯芥之原生肌球蛋白 (XI-2)，分析與野生型之外表行差異。由結果中顯示具有較快速之細胞質流之植株株型明顯較野生型及慢速細胞質流植株大，且葉面積、葉柄長度以及乾重，因而推論細胞質流之速度與植物之大小有著密切的關係 (Tominaga et al., 2013)。

而在植物之開花時間分析除了在細胞質流上之研究，還有在過度表現或是剔除表現阿拉伯芥 *AtADF* 上的一些證據也指出 ADF 與植物之進入生殖生長之開花時期有著相當重要的關係。Dong 等人 (2001) 藉由產生減少阿拉伯芥 *AtADF1*(anti-sense transgenic plant)表現之轉植株及過度表現 *AtADF1* 轉植株觀察其開花時間，由結果顯示降低此 ADF 之表現量會造成植物之延緩開花，更加確認了 ADF 與植物開花機制間的關係 (Dong et al., 2001)。然而與本篇水稻 *OsADF2* 及 *OsADF11* 轉植株不同，過度表現 *AtADF1* 會造成植物織不正常組織之發育，而導致抑制細胞生長。此現象同時也出現在異位表達棉花 *GhADF1* 於菸草中表達發現，其可能不同的原因可能是此阿拉伯芥 *AtADF1* 及




棉花 *GhADF1* 之間胺基酸序列上之相似度較高 (Li *et al.*, 2010) 而與水稻之 *OsADF2* 及 *OsADF11* 相似度較低而造成在某些重要的結合位 (binding site) 或是結構及功能上的不同而導致，然而詳細之機制可能需要利用其他實驗方法來分析之。

本篇研究之過度表現水稻肌動蛋白去聚合因子 *OsADF2* 及 *OsADF11* 可能藉由其功能而影響了植物之細胞骨架，且在蛋白質表現之次細胞定位之實驗結果中也顯示水稻 *OsADF2* 及 *OsADF11* 在細胞質中均有表現 (圖十二)，暗示著此二者應該與細胞質流的速度有所相關，進而可能導致植株具有較大之尺寸 (圖一)。在開花時間上轉植株同樣也較野生型來得提早 (圖二)，然而本次實驗未進行植株之乾重測試、計算開花時的 rosette leaves 之數量、植物細胞大小之切片觀察，以及細胞內細胞質流之速度分析，未來若需要更加研究此部分可能可以在這幾個方面去做探討，並可以更加瞭解水稻肌動蛋白去聚合因子 *OsADF2* 及 *OsADF11* 對植物生長發育之功能。

二、 探討水稻 *OsADF2* 及 *OsADF11* 於非生物逆境下之功能比較

感應外界之刺激產生對應之反應，對植物而言是十分重要的，細胞之訊息傳遞分子如鈣離子等參與此刺激，而產生之反應訊息傳遞路徑，而細胞骨架去聚合因子在前人研究中提到與鈣離子及細胞內一些激酶及磷酸化有關 (Marylin *et al.*, 2002)。在高等植物中此感應與物理性刺激如地心引力、重力、觸碰等有關，同時也與感應低溫及鹽分有關，而此感應與細胞之細胞骨架息息相關。目前在研究細胞微管 (microtubule) 感應外界訊號之反應，已有些許研究，如 2008 年 Nick 的回顧中提到三種感應外界而影響細胞膜以及其上之離子通道機制：(1) 細胞膜感應到外界之壓力 (外界之物理刺激，如機械性碰觸等)，影響到與細胞膜相連之細胞微管與細胞膜間之結構，進而打開膜上之離子通道，而改變細胞內之離子濃度，進而影響到後續之生理反應 (2) 細胞感應內生之訊號 (地心引力)，此機制下的細胞



微管與離子通道蛋白束在一起，當感應到地心引力之影響後會誘發細胞微管之去聚合，而使離子通道蛋白敞開，進而影響到細胞之生長 (3) 為對寒冷之感應，則是分為在低溫下穩定及低溫下敏感之細胞微管間的回饋機制，較為敏感之細胞微管會使細胞膜隙較為鬆散，而使得膜上之離子通道蛋白打開，進而使鈣離子得以進入細胞，反之較穩定之細胞微管則是緊密排列，使細胞膜隙緊密而導致膜上離子通道蛋白緊閉，進而不會使鈣離子進入細胞 (reviewed by Nick, 2008)。而肌動蛋白 (actin) 與細胞微管相同為細胞骨架之主要組成成分，然而目前在肌動蛋白感應外界之訊號之機制尚未明朗，但可以推論肌動蛋白應在感應外界訊號上有某些貢獻。前人研究中指出細胞肌動蛋白之穩定性對於植物在非生物逆境 (如高鹽、低溫、乾旱等) 時的生理反應以及耐受性扮演了相當重要的角色，如破壞肌動蛋白穩定性會導致植株更加不耐鹽 (Wang *et al.*, 2008)，而肌動蛋白去聚合因子 (ADF) 為調控肌動蛋白之動態平衡之其中一重要控因子，再加上實驗室的黃雅貞學姐利用異位性表達水稻 *35S::OsADF3* 於阿拉伯芥中發現可以提高阿拉伯芥於乾旱逆境之耐受性及存活率 (Huang *et al.*, 2012)，因此推論 ADF 可能與非生物逆境如高鹽、低溫、乾旱等植物反應有關，進而對 *35S::OsADF2* 及 *35S::OsADF11* 之轉殖株進行非生物逆境處理，觀察其植株之反應以及回復情形以推測此兩個水稻 *OsADF* 在植物面臨非生物逆境下之功能。

在胺基酸比對分析上水稻 *OsADF2* 及 *OsADF11* 其相似度為 77% (附錄一)，且在次細胞定位分析上顯示 *OsADF2* 及 *OsADF11* 皆有表現於細胞質中，其中 *OsADF2* 除了細胞質中有表現外也存在於葉綠體中表現 (圖十二)，顯示此兩者雖可能具有相似之細胞功能，但可能參與之胞器以及訊號反應途徑不相同，因此以本篇研究之實驗結果對此二者進行討論分析。

1. 水稻 *OsADF2* 及 *OsADF11* 參與植物面臨高鹽逆境時的耐受性之探討

Wang 等人於 2007 年的研究中提到細胞微絲不穩定會造成細胞內鈣離子濃度之變化進而造成植物細胞對鹽逆境之感知變異 (Wang *et al.*, 2007)，且在鹽份逆境下若是再以肌動蛋白聚合抑制劑 (如 Latrunculin B) 處理，會使植株對鹽逆境更加敏感，然而若是以肌動蛋白穩定劑 (如 phalloidin) 處理植株，則會增加植株的存活率 (Liu *et al.*, 2012)。以上之結果皆支持細胞骨架及肌動蛋白與鹽逆境應有相關性，而水稻 *OsAD2* 及 *OsADF11* 肌動蛋白去聚合因子與細胞骨架之動態平衡及穩定性有關，因此對轉植株及野生型進行鹽份逆境以探討此二基因在鹽份逆境下所扮演的角色。

在高鹽逆境處理之萌芽試驗中，顯示 *35S::OsADF2* 及 *35S::OsADF11* 之轉植株於 150 mM NaCl 培養基中進行萌芽勢及萌芽率皆較野生型具有較高的萌芽勢，顯示此二水稻 *OsADF2* 及 *OsADF11* 與種子對高鹽逆境的耐受性以及萌芽方面有所關聯。在種子萌芽與 ADF 的關係，由 2013 年 Cheng 等人的實驗中利用 RNAi 技術產生水稻 *OsADF* 突變品系 *osadf*，對其作種子萌芽測試後顯示若將水稻之 *OsADF* 突變後會減少種子之發芽，此現象是由於突變 ADF 會造成 α -amylase 基因抑制表現，進而導致水稻種子之發芽，因此推論水稻之萌芽與其 ADF 有關，且此相關性是由於 ADF 參與調控 α -amylase 基因表現所導致。而相對而言本篇研究為過度表達水稻 *OsADF2* 及 *OsADF11* 可增加其發芽勢，暗示著水稻之 *OsADF* 可能與種子萌芽之生理途徑或基因表現有關，也可增加鹽分逆境下之種子萌芽速度及萌芽綠，然而是否與種子萌芽時 α -amylase 基因是否因過度表現水稻 *OsADF2* 或是 *OsADF11* 而受到誘導表現則仍需後續對於種子發芽時的基因做基因表現分析才能得知。而在鹽份逆境下之種子萌芽之研究，2003 年 Shi 等人將可轉錄膜上之 Na^+/H^+ 轉運蛋白之基因 *SOS1* 過度表現於阿拉伯芥中，發現可提高阿拉伯芥於鹽份逆境下之萌芽以及生長發育之耐受性。而膜上之轉運蛋白之活性會受到細胞骨架之調控，因




此推論過度表現水稻 *OsADF2* 及 *OsADF11* 可能影響了種子於鹽份逆境下之細胞骨架，進而使得 Na^+/H^+ 轉運蛋白得以於高鹽逆境下具有正常功能，而使得種子具有較高的萌芽率 (Shi *et al.*, 2003)。

而在逆境試驗中將 5 天大及 10 天大之 *35S::OsADF2* 及 *35S::OsADF11* 之轉殖株幼苗移植至含有 150 mM NaCl 之培養基，結果顯示 *35S::OsADF2* 及 *35S::OsADF11* 之轉殖株根部生長較佳，且具有較高之存活率。2013 年 Ye 等人利用將阿拉伯芥 *SOS3* 基因剔除觀察其於高鹽逆境下之反應，發現會降低其植株存活率，且發現其 *sos3* 突變株之肌動蛋白細胞骨架於逆境下呈現鬆散狀態，當植物遭受到鹽份逆境次肌時其肌動蛋白會重組 (reorganization)，而鈣離子也參與此現象，因此 Ye 等人以外加鈣離子觀察 *sos3* 突變株之肌動蛋白細胞骨架之狀態發現可部分挽救其鬆散不正常之結構以及根部生長狀態 (Ye *et al.*, 2013)。綜合上述之前人研究結果，推論細胞骨架之構型應與鹽份逆境下植物之耐受性有關，並且由與鈣離子之間的關係推測其可能與訊息傳遞途徑有關，然而其詳細機制尚待研究，但可推論 *OsADF2* 及 *OsADF11* 可能參與在幼苗時期之高鹽逆境耐受性。


而在藉由遠紅外線熱感應影像分析植株葉溫，於一般生長環境下轉殖株與野生型無明顯差異，然而若處理 200 mM NaCl 24 小時，雖 *OsADF2* 轉殖株之葉溫與野生型無明顯差異，但皆較一般生長環境下葉溫為高，顯示其氣孔具有正常功能可於鹽份逆境中關閉；而在 *OsADF11* 轉殖株中可以發現明顯較野生型為高的葉溫，而與具有較高 ABA 之對照組 *OE2* 相似，顯示其葉片之氣孔關閉程度應較高，此現象暗示著 *OsADF11* 可能參與了在鹽份逆境下之氣孔開合之調控，或是參與其訊息傳遞途徑。而以上的實驗結果可能還需要再作其他的生理指標實驗來進行確認，如進行 MDA 及 H_2O_2 含量的測量、鹽份逆境下氣孔的開合檢測、植物體內之離子含量，統合這些生理指標後應可更加了解水稻 *OsADF2* 及 *OsADF11* 在鹽份逆境下在植物體內的功能。

2. 水稻 *OsADF2* 及 *OsADF11* 在低溫逆境下之反應探討



在 Drøbak 等人於 2004 年的回顧中提到，細胞肌動蛋白與感應外界低溫之接受訊息及產生反應是十分重要的 (Drøbak *et al.*, 2004)，且低溫會造成細胞膜之膜隙改變，如低溫較敏感者細胞膜會出現鬆散之情形，進而導致細胞受損、破裂甚至是死亡。因此欲了解在低溫逆境下水稻 ADF 之功能，遂進行阿拉伯芥成株之低溫逆境測試。然而在本篇研究中以 4°C 處理阿拉伯芥目前只觀察到低溫會延緩植物之生育時期，而因低溫而導致較明顯之茸毛 (Trichome) 則同時於轉植株、野生型中皆有所觀察，雖然目前已知肌動蛋白與植物之茸毛發育有關 (Marthur *et al.*, 1999)，然而於顯微鏡下觀察無明顯差異。而相較於實驗對照組之植株已抽苔、開花及結莢，21 天大後轉移至低溫生長箱之阿拉伯芥之花芽分化及抽苔皆受到延緩，直到生長至第 5 周 (35 天大) 即使有花芽分化卻仍尚未抽苔，然而植物之外表型皆仍維持正常生長，惟 35S::*OsADF11* 轉植株之葉片在移至低溫生長箱培養 7 天後出現些許受傷情形，而 35S::*OsADF2* 轉植株則是與野生型無明顯差異 (圖七、圖十)。Fukaki 等人於 1996 年研究低溫對阿拉伯芥之生長關係做重力刺激分析，結果顯示處理 3 小時低溫並不會影響到其感應重力，然而若是先於 4°C 下進行重力刺激試驗後再移至室溫，結果顯示回到室溫後才發生於低溫下之重力刺激反應，此暗示著在低溫下確實有重力之感應，但植物細胞卻無法產生對應反應，可能是由於低溫而造成訊息傳遞上之問題而導致 (Fukaki *et al.*, 1996)。而 Egierszдорff 及 Kacperska 於 2001 年分析低溫下不同生長階段之油菜空泡細胞 (vacuolated cell) 肌動蛋白之反應，六天大之細胞受低溫處理後會停止生長，並且肌動蛋白增厚以及出現不正常之堆疊，並且對不同生長階段以及是否經由低溫馴化做比較，顯示植物細胞以及其肌動蛋白對於極低溫逆境 (freeze) 的耐受性是受到細胞之生長階段而不是是否經由馴化 (Egierszдорff & Kacperska, 2001)。


由於阿拉伯芥本身屬溫帶植物為耐冷型之植物，對於低溫之逆境之耐受性



較水稻為高，在觀察外表型態上而言或許無法有明確的外表型變化結果可供比較，未來可能增加逆境的強度，根據 Ruzicka (2008) 對於 *atadf5* 突變株低溫處理之條件如下：-16°C 處理 12 分鐘後移至 4°C 培養一小時，接著再移回 22°C 生長箱，並且可以利用檢測離子滲漏 (ion leakage) 之程度來辨別植物於低溫下之生理改變以及細胞因低溫所受到之傷害，或是進行重力刺激測試植物反應，以及對於不同生長階段之植株進行低溫逆境分析，以便更加了解水稻 *OsADF2* 及 *OsADF11* 與植物面臨低溫逆境時之反應是否有所相關聯。

3. 水稻 *OsADF2* 及 *OsADF11* 參與植物面臨乾旱逆境時的耐受性之探討

在以乾旱逆境處理 21 天之 *35S::OsADF2* 及 *35S::OsADF11* 的轉植株觀察其反應，在處理 7 天後實驗控制組 (Negative control) 之 *N3 (atnced3)* 葉片已出現嚴重萎凋、花序倒伏現象，同時野生型 *Col-0* 也出現葉片皺縮、花序倒伏、花青素累積之現象，而 *35S::OsADF2* 轉植株三個品系 (*OsADF2-3*、*OsADF2-4*、*OsADF2-6*) 中與對照組相比雖有受到因乾旱而造成之生長減慢，但是仍表現維持正常生長，其中雖 *OsADF2-3* 品系之植株葉片有出現花青素累積現象，但植物之葉片、花序等皆維持正常表現，因此可以推論水稻 *OsADF2* 確實應與植物面臨乾旱逆境之反應有關；而 *35S::OsADF11* 的轉植株三個品系 (*OsADF11-1*、*OsADF11-2*、*OsADF11-3*) 中皆表現維持正常生長，且生長型態與對照組相比無明顯差異，葉片仍呈現健康狀態。接著持續以乾旱處理第 12 天後可觀察到 *N3* 已完全萎凋，野生型 *Col-0* 則是葉片萎凋捲曲之程度十分嚴重，*35S::OsADF2* 轉植株三個品系之葉片則是開始出現捲曲皺摺之現象，且花序出現倒伏的現象，而 *35S::OsADF11* 的轉植株三個品系除 *OsADF11-1* 品系之葉片萎凋捲曲之程度較大外，其他兩個品系之葉片僅出現些許皺褶捲曲。接著進行復水恢復後觀察植株之恢復反應，復水第一天 *35S::OsADF2* 轉植株三個品系以及 *35S::OsADF11* 的轉植株三個品系皆立即有明顯回復之現象出現，



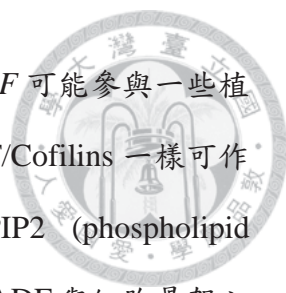
而以 35S::*OsADF11* 的轉植株之回復效果較佳，其中作為正向控制組之 *OE2* (35S::*LfNCED3*) 轉植株也有些許回復之表現，負向控制組之 *N3* 則是無回復之現象，持續復水 5 天後 35S::*OsADF2* 轉植株及 35S::*OsADF11* 轉植株幾乎完全回復狀態 (圖六、圖九)。由紅外線熱感應影像分析中 35S::*OsADF11* 之轉植株在經由 200 mM NaCl 處理後顯示具有較高的葉溫，推論水稻 *OsADF11* 可能具有促使鹽份逆境下之氣孔關閉之功能而使葉溫較高，然而在 *OsADF2* 之轉植株中並沒有此現象發生，在 1997 年 Eun 等人研究離層酸 (ABA) 與植物氣孔保衛細胞內之細胞骨架與氣孔開合之關係，顯示關閉中的氣孔之保衛細胞內之骨架為片段 (fragment) 之結構，此現象即為細胞內 ADF 之功能所造成。(Eun *et al.*, 1997)。而在成株之乾旱逆境處理分析中顯示，35S::*OsADF2* 轉植株在以乾旱處理 12 天後葉片之萎凋程度較大，然而 *OsADF11* 轉植株僅有些許葉片皺縮現象，且由復水後之恢復表現中可觀察到雖然 *OsADF2* 及 *OsADF11* 轉植株皆有明顯較野生型 Col-0 及實驗對照組 *OE2* 之回復能力高，暗示著水稻 *OsADF2* 及 *OsADF11* 可能參與了植物之乾旱逆境耐受性，且兩者所參與之生理途徑及反應機制可能不同而導致。以上之結果顯示過度表現水稻肌動蛋白去聚合因子可能參與植物在乾旱逆境下之耐受性，並與植物在乾旱逆境下之復元能力相關，推論此現象應該與肌動蛋白去聚合因子參與植物之細胞重組而導致。可以與 2005 年 Ali 等人發現有一水稻 *OsADF* 蛋白質會在水稻受到乾旱逆境而大量誘導累積，並且在耐旱之水稻中發現有大量累積現象 (Ghulam *et al.*, 2005)，以及 2005 年 Liu 等人於乾旱處理後水稻中發現 *OsADF5* 會大量累積，而復水後發現此累積現象會消失 (Liu *et al.*, 2005) 等研究結果相互比較，而在本篇研究中 *OsADF2* 及 *OsADF11* 轉植株在乾旱逆境處理下具有較高之耐受性，可以推論出水稻 *OsADF* 可能參與植物之耐旱機制。然其細胞內部之重組及復元以目前我們所具有之技術及時間而言仍無法得知，未來可能可以利用 Actin binding protein 與 GFP 之融合蛋白 (ABP-GFP) 轉殖於阿拉

伯芥，以此與 *OsADF2* 或 *OsADF11* 轉植株進行雜交產生後代，或是直接以此 ABP-GFP 轉植株作野生型進行農桿菌轉殖，或是利用肌動蛋白染色劑染色，以觀察在乾旱逆境下之植物細胞骨架與 *OsADF2* 及 *OsADF11* 之間之相互反應。

三、 水稻 *OsADFs* 基因家族之次細胞定位分析之結果探討

由前人之研究中可得知阿拉伯芥 *AtADF* 蛋白質的表現位置可分為兩個次群，第一次群為蛋白質表現於阿拉伯芥葉肉細胞之細胞質以及核中表現，而第二次群則是主要在根毛以及花粉管的尖端及延長部位之細胞質中表現 (Ruzicka *et al.*, 2007)。本篇論文使用 PEG 轉殖技術進行水稻之 *OsADF1*-GFP、*OsADF2*-GFP、*OsADF3*-GFP、*OsADF4* -GFP、*OsADF5*-GFP、*OsADF6*-GFP、*OsADF7*-GFP、*OsADF11*-GFP 融合蛋白之次細胞定位分析，結果發現水稻 *OsADF1*-GFP、*OsADF2*-GFP、*OsADF4*-GFP、*OsADF5*-GFP 及 *OsADF6*-GFP 融合蛋白表現位於葉綠體，而 *OsADF2*-GFP、*OsADF3*-GFP 及 *OsADF11*-GFP 融合蛋白表現位於細胞核及細胞質，其中 *OsADF2*-GFP 同時存在於細胞核質以及葉綠體中表現，以上之水稻原生質體次細胞定位實驗皆重複三次，並且皆有以 *CYH8-Ub::GFP* 作為對照組確定轉殖是否成功，並且計算轉殖效率 (轉殖成功率 > 50，即視野下至少有一半以上之原生質體具有 *GFP* 螢光表現)(圖十二)。

然而在本次實驗中 *OsADF1*-GFP、*OsADF2*-GFP、*OsADF4*-GFP、*OsADF5*-GFP 及 *OsADF6*-GFP 之融合蛋白表現於葉綠體中之結果與 2007 年 Ruzicka 分析阿拉伯芥表現部位之兩個次群 (細胞核質中表達、細胞質中表達) 並不完全相符，推測可能原因為水稻 *ADF* 及阿拉伯芥 *ADF* 之序列上雖相似度高，在相異之胺基酸序列上可能會造成特定之功能以及結合位有所差異，因而導致表現位置不同。如以胺基酸序列相似度之基因演化樹 (附錄一) 分群中顯示 D 群中僅阿拉伯芥 *AtADF1*、*AtADF2*、*AtADF3*、*AtADF4*，而 F 群則是只含有水稻 *OsADF7*、*OsADF8* 及 *OsADF10*，



顯示可能具有其特化之表現部位，且由前人研究中皆有指出 *ADF* 可能參與一些植物細胞內之訊息傳遞，但是植物之 *ADFs* 蛋白是否與動物之 *ADF/Cofilins* 一樣可作為接受刺激反應之調控者，目前已有證據顯示 *PIP2* (phospholipid phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) 以及 protein kinase C 參與 *ADF* 與細胞骨架之間動態平衡，然而其詳細之機制仍然未知 (Nick, 2013)，而葉綠體之運移以及功能表現也受到細胞骨架之調控，因此推論此些水稻 *ADF* 表現於葉綠體可能與葉綠體之一些相關之生理途徑相關，然其功能及參與途徑仍尚待後續實驗再探討。


四、 結語

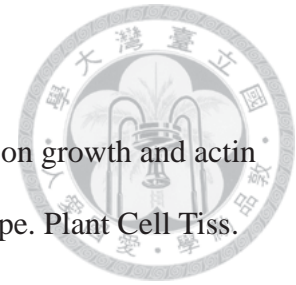
植物之細胞骨架與其生長發育、生理活動以及非生物逆境耐受性息息相關，其穩定性在植物面臨非生物逆境而言是非常重要的。本篇研究主要專注於水稻之 *OsADF2* 及 *OsADF11* 之功能性研究，藉由異位大量表現 *OsADF2* 及 *OsADF11* 基因於阿拉伯芥植株中研究此二基因之生理功能。由以上種種結果顯示大量表現 *OsADF2* 以及 *OsADF11* 之阿拉伯芥轉殖株較野生型可能具有高鹽逆境以及乾旱逆境耐受性，然而其中所參與之生理機制，仍須再以基因表現分析，以及其他生理指標調查分析，以研究水稻 *OsADF2* 以及 *OsADF11* 如何影響植物在高鹽及乾旱逆境下之逆境耐受性。

參考文獻



- Abdrakhamanova A., Wang Q.Y., Khokhlova L., Nick P.** (2003) Is microtubule disassembly a trigger for cold acclimation? *Plant Cell Physiol.*, **44**: 676–686
- Allwood E. G., Anthony R.G., Smertenko A.P., Reichelt S., Drobak B.K., Doonan J.H., Weeds A.G., Hussey P.J.** (2002) Regulation of the pollen-specific actin-depolymerizing factor *LIADF1*. *Plant Cell*, **14**: 2915–2927
- Arbona V., Manzi M., Ollas C.de., Gómez-Cadenas A.** (2013) Metabolomics as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. *Int. J. Mol. Sci.*, **14**: 4885-4911
- Blanchoin L., Boujemaa-Paterski R., Henty J.L., Khurana P., Staiger C.J.** (2010) Actin dynamics in plant cells: a team effort from multiple proteins orchestrates this very fast-paced game. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **13**: 714 – 723
- Chaves M.M., Maroco J.P., Pereira J.S.** (2003) Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* **30**: 239–264.
- Chen H.C., Hwang S.G., Chen S.M., Shii C.T., Cheng W.H.** (2011) ABA-mediated heterophylly is regulated by differential expression of 9-cis-expoxycarotenoid dioxygenase 3 in lilies. *Plant Cell Physiol.*, **52**: 1806-1821.
- Cheng X., Wu Y., Guo J., Du B., Chen R., Zhu L., He G.** (2013) A rice lectin receptor-like kinase that is involved in innate immune responses also contributes to seed germination. *Plant J.*, **76**: 687–698
- Chi J., Han Y.C., Wang X.F., Wu L.H., Zhang G.Y., Ma Z.Y.** (2013) Overexpression of the *Gossypium barbadense* actin-depolymerizing factor 1 gene mediates biological changes in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **31**:833–839
- Clough S.J. and Bent A.F.** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**: 735–743

- 
- Costa J.M., Grant O.M., Chaves M.M.** (2013) Thermography to explore plant–environment interactions. *J. Exp. Bot.*, **64**: 3937–3949
- D’Angeli S. and Altamura M.** (2007) Osmotin induces cold protection in olive trees by affecting programmed cell death and cytoskeleton organization. *Planta*. **225**: 1147–1163
- Daher F. B. and Geitmann A.** (2012) Actin depolymerizing factors *ADF7* and *ADF10* play distinct roles during pollen development and pollen tube growth. *Plant Signal Behav.* **7**: 879–881
- Darwin C.** (1859) *On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favored races in the struggle for life.* Murray, John, London.
- Deeks, Michael J, and Hussey, Patrick J.** (2009) Plant actin biology. In: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. <http://www.els.net> [doi: 10.1002/9780470015902.a0021255]
- Dong C.H. and Yan H.** (2013) *Arabidopsis* CDPK6 phosphorylates *ADF1* at N-terminal serine 6 predominantly. *Plant Cell Rep.* **32**:1715–1728
- Dong C.H., Kost B., Xia G., Chua N.H.** (2001) Molecular identification and characterization of the *Arabidopsis* *AtADF1*, *AtADF5* and *AtADF6* genes. *Plant Mol. Biol.* **45**: 517–527
- Dong C.H., Xi G.X., Hong Y., Ramachandran S., Kost B., Chua N.H.** (2001) ADF proteins are involved in the control of flowering and regulate F-Actin organization, cell expansion, and organ growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **13**: 1333–1346
- Drøbak B. K., Franklin-Tong V. E., Staiger C. J.** (2004) The role of the actin cytoskeleton in plant cell signaling. *New Phytol.* **163**: 13–30
- Durst S., Nick P., Maisch J.** (2013) *Nicotiana tabacum* actin-depolymerizing factor 2 is involved in actin-driven, auxin-dependent patterning. *J. Plant Physiol.* **170**: 1057–



- Egierszdorff S. and Kacperska A.** (2001) Low temperature effects on growth and actin cytoskeleton organisation in suspension cells of winter oilseed rape. *Plant Cell Tiss. Org.* **65**: 149–158
- Eun S.O. and Lee Y.** (1997) Actin filaments of guard cells are reorganized in response to light and abscisic acid. *Plant Physiol.* **115**: 1491-1 498
- Feng Y., Liu Q., Xue Q.Z.** (2006) Comparative study of rice and *Arabidopsis* actin-depolymerizing factors gene families. *J Plant Physiol.* **163**: 69-79
- Fukaki H., Fujisawa H., Tasaka M.** (1996) Gravitropic response of inflorescence stems in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **110**: 933–943
- Gungabissoon R.A., Jiang C.J., Drøbak B.K., Maciver S.K., Hussey P. J.** (1998) Interaction of maize actin-depolymerising factor with actin and phosphoinositides and its inhibition of plant phospholipase C. *Plant J.* **16**: 689–696
- Ghulam M. A. and Setsuko K.** (2005) Proteomic analysis of rice leaf sheath during drought stress. *J Proteome Res.* **5**: 396-403
- Henty-Ridilla J.L., Li J., Blanchoin L., Staiger C.J.** (2013) Actin dynamics in the cortical array of plant cells. *Curr. Opin. Plant Biol.* **16**: 678–687
- Huang Y.C., Huang W.L., Hong C.Y., Lur H.S., Chang M.C.** (2012) Comprehensive analysis of differentially expressed rice actin depolymerizing factor gene family and heterologous overexpression of *OsADF3* confers *Arabidopsis Thaliana* drought tolerance. *Rice.* **5**: 33-47
- Hussey P.J., Ketelaar T., Deeks M.J.** (2006) Control of the actin cytoskeleton in plant cell growth. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**:109–25
- Hussey P.J., Yuan M., CalderG., Khan S., Lloyd C.** (1998) Microinjection of pollen-specific actin-depolymerizing factor, ZmADF1, reorientates F-actin strands



in *Tradescantia* stamen hair cells. *Plant J.* **14**: 353–357.

Hwang J.U. and Lee Y. (2001) Abscisic acid-induced actin reorganization in guard cells of dayflower is mediated by cytosolic calcium levels and by protein kinase and protein phosphatase activities. *Plant Physiol.* **125**: 2120-2128

Jiang C. J., Weeds A.G., Hussey P.J. (1997a) The maize actin depolymerizing factor, *ZmADF3*, redistributes to the growing tip of elongating root hairs and can be induced to translocate into the nucleus with actin. *Plant J.* **12**: 1035–1043

Jiang C.J., Weeds A.G., Khan S., Hussey P.J. (1997b) F-actin and G-actin are uncoupled by mutation of conserved tyrosine residues in maize actin depolymerizing factor (*ZmADF*). *Plant Biol.* **94**: 9973-9978


Komis G., Apostolakos P., Galatis B. (2002) Hyperosmotic-induced actin filament reorganization in leaf cells of *Chlorophyton comosum*. *J. Exp. Bot.* **53**: 1699-1710

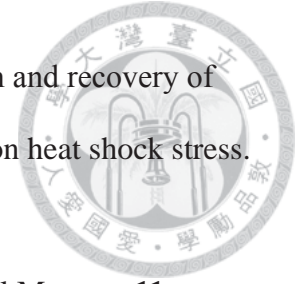
Krtková J., Havelková L., Krepelová A., Fiser ., Vosolsobe S., Novotná ., Martinec J., Schwarzerová K. (2012) Loss of membrane fluidity and endocytosis inhibition are involved in rapid aluminum-induced root growth cessation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem.* **60**: 88-97

Li X.B., Xu D., Wang X.L., Huang G.Q., Luo J., Li D.D., Zhang Z.T., Xu W.L. (2010) Three cotton genes preferentially expressed in flower tissues encode actin-depolymerizing factors which are involved in F-actin dynamics in cells. *J Exp. Bot.* **61**: 41–53

Liu J.X., Raveendran M., Mushtaq R., Ji X.M., Yang X., Bruskiwich R., Katiyar S., Cheng S., Bennett J. (2005) Proteomic analysis of drought-responsiveness in rice: OsADF5 , in: *Proceedings of an International Congress “In the Wake of the Double Helix: From the Green Revolution to the Gene Revolution”*, 27–31 May 2003, Bologna, Italy, R. Tuberosa, R. L. Phillips and M. Gale, eds., Avenue media,

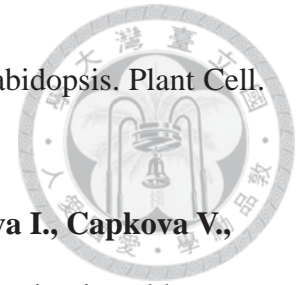
Bologna, pp. 491–505

- 
- Liu S.G., Zhu D.Z., Chen G.H., Gao X.Q., Zhang X.S.** (2012) Disrupted actin dynamics trigger an increment in the reactive oxygen species levels in the *Arabidopsis* root under salt stress. *Plant Cell Rep.* **31**: 1219–1226
- Liu W., Ji S., Fang X.L., Wang Q.G., Li Z., Yao F.Y., Hou L., Dai S.** (2013) Protein Kinase *LTRPK1* influences cold adaptation and microtubule stability in rice. *J Plant Growth Regul.* **32**: 483-490
- Lu B., Gong Z.G., Wang J., Zhang J.H., Liang J.S.** (2007) Microtubule dynamics in relation to osmotic stress-induced ABA accumulation in *Zea mays* roots. *J. Exp. Bot.* **58** : 2565–2572.
- Maciver S.K., Hussey P.J.** (2002) The ADF/cofilin family: actin-remodeling proteins. *Biology.* **3**: reviews 3007.1–3007.12
- Malerba M., Crosti P., Cerana R.** (2010) Effect of heat stress on actin cytoskeleton and endoplasmic reticulum of tobacco BY-2 cultured cells and its inhibition by Co^{2+} *Protoplasma.* **239**: 23–30
- Marylin V., Laurent B.** (2002) Actin polymerization processes in plant cells. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 502-506
- Marthur J., Spielhofer P., Kost B., Chua N.H.** (1999). The actin cytoskeleton is required to elaborate and maintain spatial patterning during trichome cell morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Development.* **126**: 5559–5568.
- Mazars C., Thion L., Thuleau P., Graziana A., Knight M.R., Moreau M., Ranjeva R.** (1997) Organization of cytoskeleton controls changes in cytosolic calcium of cold-shocked *Nicotiana plumbaginifolia* protoplasts. *Cell Calcium.* **22**: 413–420
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Van B.F.** (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* **9**:490–498



- Müller J., Menzel D., Samaj J.** (2007) Cell-type-specific disruption and recovery of the cytoskeleton in *Arabidopsis thaliana* epidermal root cells upon heat shock stress. *Protoplasma*. **230**: 231–242
- Nick P.** (2008) Microtubules as sensors for abiotic stimuli. *Plant Cell Monogr.* **11**: 175-203
- Nick P.** (2013) Microtubules, signalling and abiotic stress. *Plant J.* **75**: 309–323
- Ono S.** (2007) Mechanism of depolymerization and severing of actin filaments and its significance in cytoskeletal dynamics. *Int. Rev. Cytol.* **258**: 1-82
- Örvar B.L., Sangwan V., Omann F., Dhindsa R.S.** (2000) Early steps in cold sensing by plant cells, the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant J.* **23**:785–794
- Osakabe Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., Lam-Son P.T.** (2013) Sensing the environment: key roles of membrane-localized kinases in plant perception and response to abiotic stress. *J. Exp. Bot.* **64**: 445–458
- Ouellet F., Carpentier E., Cope M.J.T.V., Monroy A.F., Sarhan Fathey** (2001) Regulation of a wheat actin-depolymerizing factor during cold acclimation. *Plant Physiol.* **125**: 360-368
- Paque S., Mouille G., Grandont L., Alabadí D., Gaertner C., Goyallon A., Muller P., Primard-Brisset C., Sormani R., Blázquez M.A., Perrot-Rechenmann C.** (2014) Auxin binding protein1 links cell wall remodeling, auxin signaling, and cell expansion in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **26**: 280–295
- Peremyslov V.V., Prokhnevsky A.I., Avisar, D., Dolja, V.V.** (2008). Twoclass XI myosins function in organelle trafficking and root hair development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **146**:1109–1116.
- Peremyslov, V.V., Prokhnevsky, A.I., Dolja, V.V.** (2010). Class XI myosins are required

for development, cell expansion, and F-actin organization in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **22**: 1883–1897.



Pokorna J., Schwarzerova K., Zelenkova S., Petrasek J., Janotova I., Capkova V.,

Opatrny Z. (2004) Sites of actin filament initiation and reorganization in cold treated tobacco cells. *Plant Cell Environ.* **27**:641–653

Pollard T.D. (1986) Actin and actin-binding protein: a critical evaluation of mechanisms and functions. *Ann. Rev. Biochem.* **55**: 987-1035

Porter K., Shimono M., Tian M., Day B. (2012) *Arabidopsis* Actin-Depolymerizing Factor-4 links pathogen perception, defense activation and transcription to cytoskeletal dynamics. *PLoS Pathog* 8: e1003006. doi: 10.1371/ journal. ppat. 1003006

Prokhnevsky A.I., Peremyslov V.V., Dolja V.V. (2008). Overlapping functions of the four class XI myosins in *Arabidopsis* growth, root hair elongation, and organelle motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**: 19744–19749.

Reddy A.S. (2001). Molecular motors and their functions in plants. *Int. Rev. Cytol.* **204**: 97–178.

Ruzicka D.R., Muthugapatti K.K., Elizabeth C. M., Brunilis B.R., Richard B. M. (2007) The ancient subclasses of *Arabidopsis* actin depolymerizing factor genes exhibit novel and differential expression. *Plant J.* **52**: 460–472

Sangwan V., Foulds I., Singh J. and Dhindsa R.S. (2001) Cold-activation of *Brassica napus* BN115 promoter is mediated by structural changes in membranes and cytoskeleton, and requires Ca^{2+} influx. *The Plant J.* **27**:1-12

Schmelzer E. (2002) Cell polarization, a crucial process in fungal defence. *Trends Plant Sci.* **7**: 411-415

Shi H., Lee B.H., Wu S.J., Zhu J.K. (2003) Overexpression of a plasma membrane

Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Nat.

Biotechnol. **21**: 81-85

Shimmen T. and Yokota E. (2004). Cytoplasmic streaming in plants. Curr. Opin. Cell Biol. **16**: 68–72.

Smertenko A.P., Deeks M.J., Hussey P.J. (2010) Strategies of actin reorganisation in plant cells. J Cell Sci. **123**: 3019-3028

Tian M., Chaudhry F., Ruzicka D.R., Meagher R.B., Staiger C.J., Day B. (2009) *Arabidopsis* actin-depolymerizing factor *AtADF4* mediates defense signal transduction triggered by the *Pseudomonas syringae* effector *AvrPphB*. Plant Physiol. **150**: 815–824

Tominaga M., Kimura A., Yokota E., Haraguchi T., Shimmen T., Yamamoto K., Nakano A., Ito K. (2013) Cytoplasmic streaming velocity as a plant size determinant. Dev. Cell. **27**: 345–352

Ueda H., Yokota E., Kutsuna N., Shimada T., Tamura K., Shimmen T., Hasezawa S., Dolja V.V., Hara-Nishimura I. (2010). Myosin-dependent endoplasmic reticulum motility and F-actin organization in plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **107**: 6894–6899.

Wan L. and Zhang H. (2012) Cadmium toxicity : Effects on cytoskeleton, vesicular trafficking and cell wall construction. Plant Signal Behav. **7** : 345–348

Wang C., Li J., Yuan M. (2007) Salt tolerance requires cortical microtubule reorganization in *Arabidopsis*. Plant Cell Physiol. **48**: 1534–1547

Wang C., Zhang L., Yuan M., Ge Y., Liu Y., Fan J., Ruan Y., Cui Z., Tong S., Zhang S. (2008) The microfilament cytoskeleton plays a vital role in salt and osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*. Plant Biol. **12**: 70–78

Wang C. , Zhang L.J., Chen W.F. (2011a) Plant cortical microtubules are putative



sensors under abiotic stresses. *Biochemistry (Moscow)* **76**: 320-326

Wang C., Zhang L.J., Huang R.D. (2011b) Cytoskeleton and plant salt stress tolerance.

Plant Signal Behav. **6**: 29-31

Wasteneys G.O. and Yang, Z. (2004) New views on the plant cytoskeleton. *Plant*

Physiol. **136**: 3884–3891

Yamaguchi T., Yamada A., Hong N., Ogawa T., Ischii T., Shibuya N. (2000)

Differences in the recognition of glucan elicitor signals between rice and soybean:

β -Glucan fragments from the rice blast disease fungus *Pyricularia oryzae* that elicit phytoalexin biosynthesis in suspension-cultured rice cells. *Plant Cell.* **12**: 817-826

Yamamoto K. (2008). Plant myosins VIII, XI, and XIII. In *Myosins: A Superfamily of molecular motors*, L.M. Coluccio, ed. (Berlin: Springer) pp.375–390.

Ye J.M., Zhang W.H., Guo Y. (2013) *Arabidopsis* SOS3 plays an important role in salt tolerance by mediating calcium-dependent microfilament reorganization. *Plant Cell Rep.* **32**: 139–148

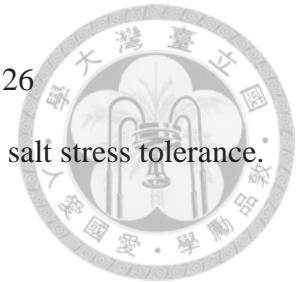
Zhao Y., Pan Z., Zhang Y., Qu X.L., Zhang Y.G., Yang Y.Q., Jiang X.N., Huang S.J.,

Yuan M., Schumaker Karen S., Guo Y. (2013) The actin-related protein2/3

complex regulates mitochondrial-associated calcium signaling during salt stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **25**: 4544–4559

Zheng Y.Y., Xie Y.R., Jiang Y.X., Qu X.L., Huang S.J. (2013) *Arabidopsis*

actin-depolymerizing factor7 severs actin filaments and regulates actin cable turnover to promote normal pollen tube growth. *Plant Cell.* **25**: 3405–3423

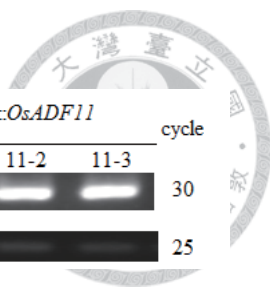


表一、 水稻肌動蛋白去聚合因子(OsADFs) 家族成員基因序號相關資訊

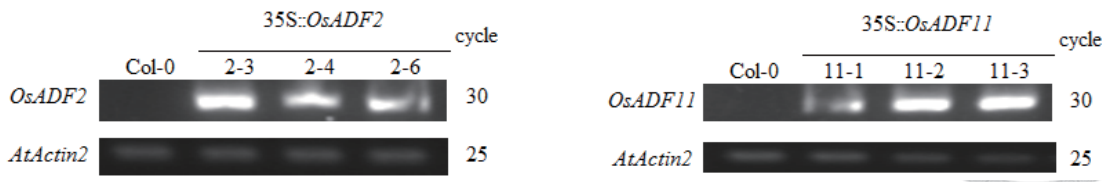
Gene Name	Chr.	Genebank ID	TIGR Locus Number	KOME Accession Number	Rap-db ID	Group *
<i>OsADF1</i>	2	AP004037	LOC_Os02g44470	AK069605	Os02t0663800-01	C
<i>OsADF2</i>	3	AC084320	LOC_Os03g56790	AK073162	Os03t0780400-01	A
<i>OsADF3</i>	3	AC104433	LOC_Os03g60580	AK058941	Os03t0820500-01	E
<i>OsADF4</i>	3	AC104433	LOC_Os03g60590	AK241081	Os03t0820600-01	E
<i>OsADF5</i>	3	AC134239	LOC_Os03g13950	AK104056	Os03t0243100-01	B
<i>OsADF6</i>	4	AL606647	LOC_Os04g46910	AK069329	Os04t0555700-01	C
<i>OsADF7</i>	5	AC093921	LOC_Os05g02250	AK102177	Os05t0113400-01	F
<i>OsADF8</i>	7	AP006344	LOC_Os07g20170	AK064565	Os07t0298900-01	F
<i>OsADF9</i>	7	AP005465	LOC_Os07g30090	AK072721	Os07t0484300-01	C
<i>OsADF10</i>	10	AC051634	LOC_Os10g37670	AK121749	Os10t0521100-01	F
<i>OsADF11</i>	12	AC027133	LOC_Os12g43340	AK121150	Os12t0628100-01	A

表二、 水稻肌動蛋白去聚合因子(OsADFs) 家族成員之次細胞定位

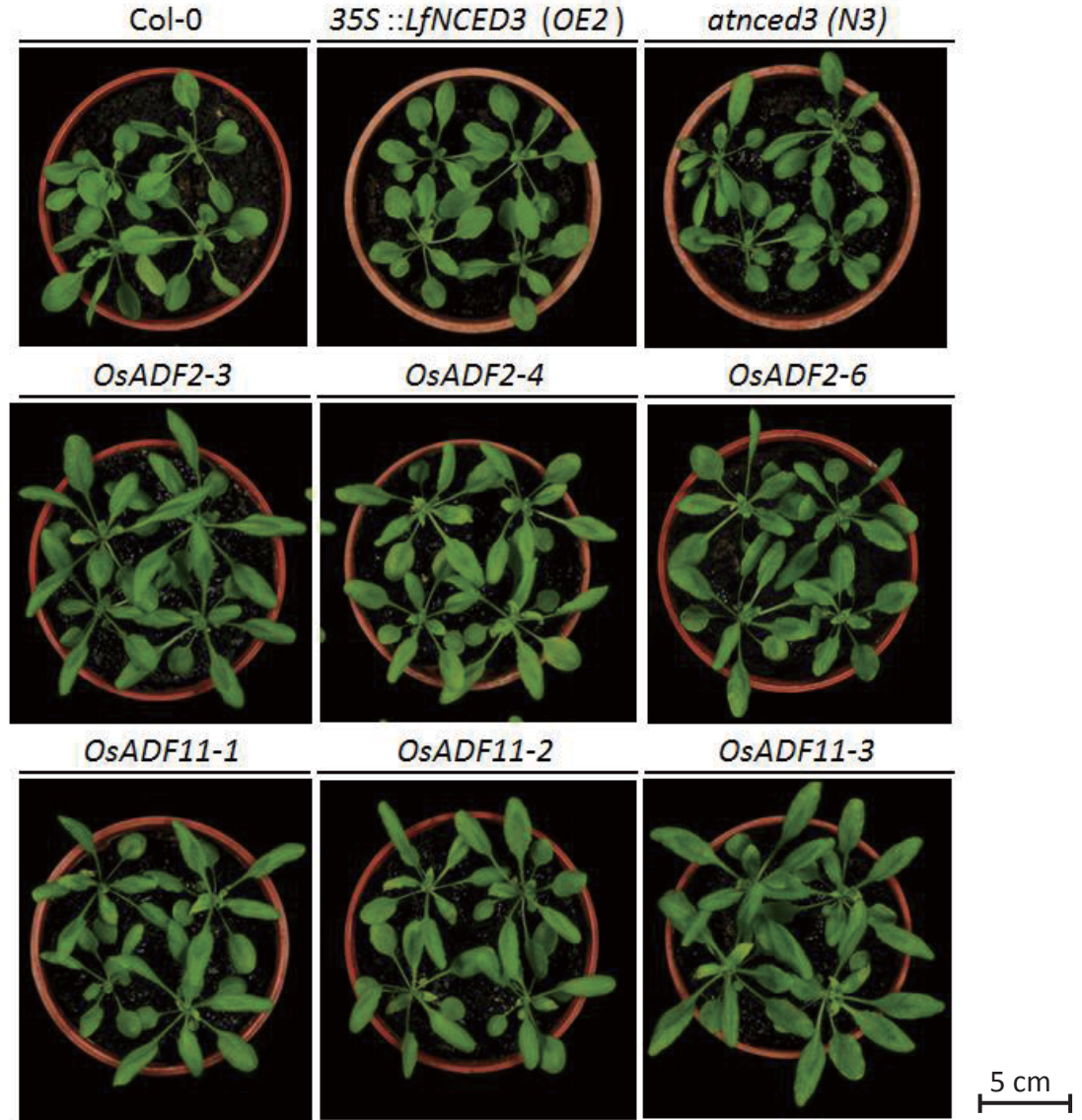
Gene Name	Construct	Subcellular Localization	Group
<i>OsADF1</i>	CYH8-Ub:: <i>OsADF1</i> -GFP	Chloroplast	C
<i>OsADF2</i>	CYH8-Ub:: <i>OsADF2</i> -GFP	Chloroplast, Cytosol	A
<i>OsADF3</i>	CYH8-Ub:: <i>OsADF3</i> -GFP	Cytosol, Nucleus	E
<i>OsADF4</i>	CYH8-Ub:: <i>OsADF4</i> -GFP	Chloroplast	E
<i>OsADF5</i>	CYH8-Ub:: <i>OsADF5</i> -GFP	Chloroplast	B
<i>OsADF6</i>	CYH8-Ub:: <i>OsADF6</i> -GFP	Chloroplast	C
<i>OsADF11</i>	CYH8-Ub:: <i>OsADF11</i> -GFP	Cytosol, Nucleus	A



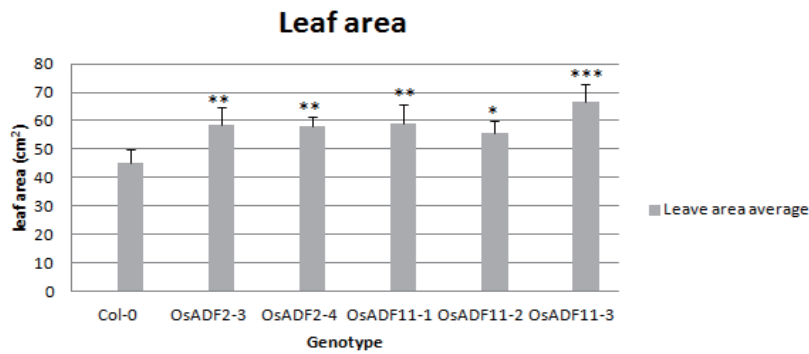
(A)



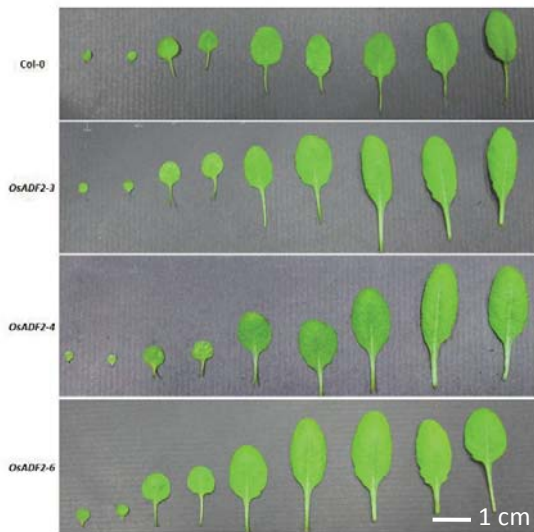
(B)



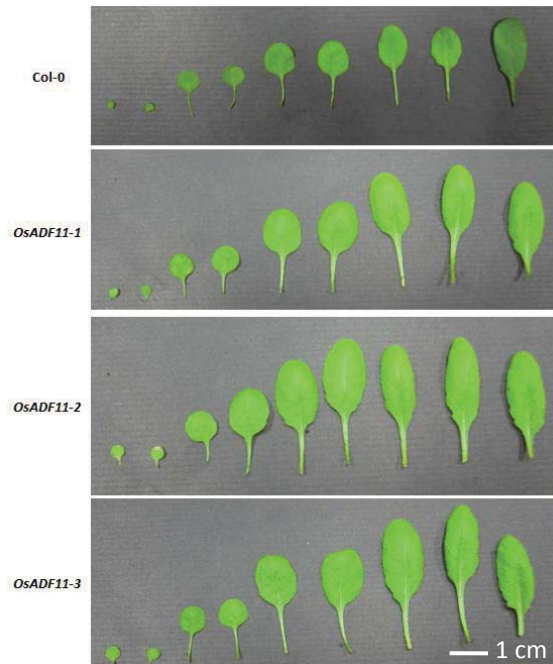
(C)



(D) (i)



(ii)



圖一、異位表達水稻 *OsADF2* 及 *OsADF11* 轉殖株之分子鑑定與外表型分析

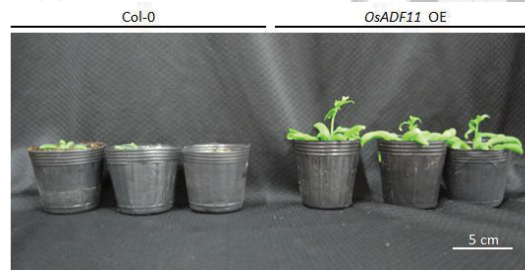
- (A) 以 RT-PCR 偵測 *OsADF2*-OE 與 *OsADF11*-OE 阿拉芥轉殖株之 *OsADF2* 及 *OsADF11* 基因表現結果。
- (B) 於一般環境下之阿拉伯芥野生型 Col-0、*NCED3 OE2*、*NCED3 mutant n3*、阿拉伯芥 *OsADF2*、*OsADF11* 轉殖株之外表型
- (C) 於一般環境下阿拉伯芥野生型 Col-0、*NCED3 OE2*、*NCED3 mutant n3*、阿拉伯芥 *OsADF2*、*OsADF11* 轉殖株之葉面積大小分析，以 Image-J 測量各葉片面積總合後以 R 分析，每個基因型重複數為 8 次。*表示 $P < 0.05$; **表示 $P < 0.01$ 與野生型相比有顯著性差異。
- (D) 野生型 Col-0 阿拉伯芥與 (i) *OsADF2* 轉殖株三個具有代表性之品系之葉片外表型，(ii) *OsADF11* 轉殖株三個具有代表性之品系之葉片外表型。



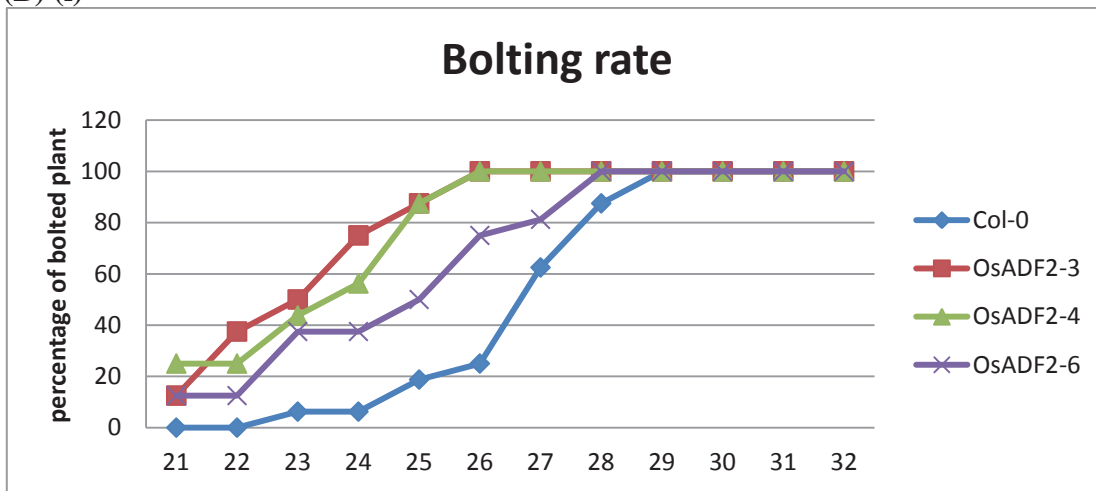
(A) (i)



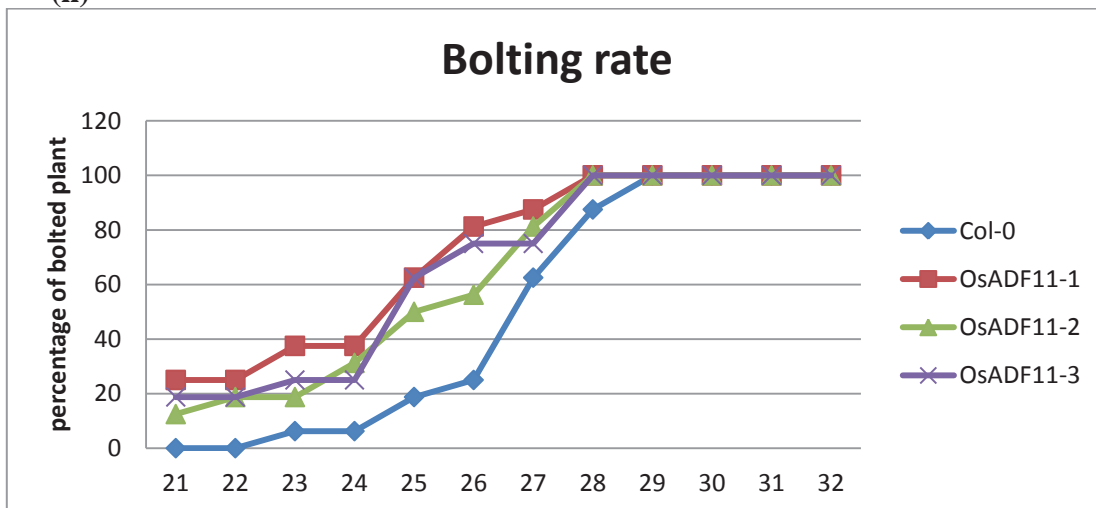
(ii)



(B) (i)



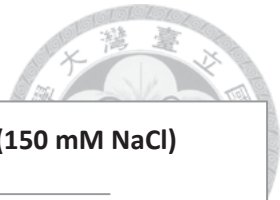
(ii)



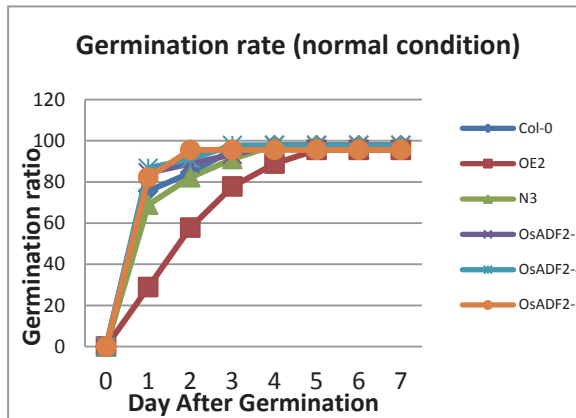
圖二、阿拉伯芥過度表現水稻 *OsADF2* 及 *OsADF11* 轉殖株之抽苔及開花時間與野生型 Col-0 之分析比較

(A) 種植 21 天大之 (i) *35S::OsADF2* 轉殖株及 (ii) *35S::OsADF11* 轉殖株與野生型 Col-0 之外表型，Bar = 5 cm

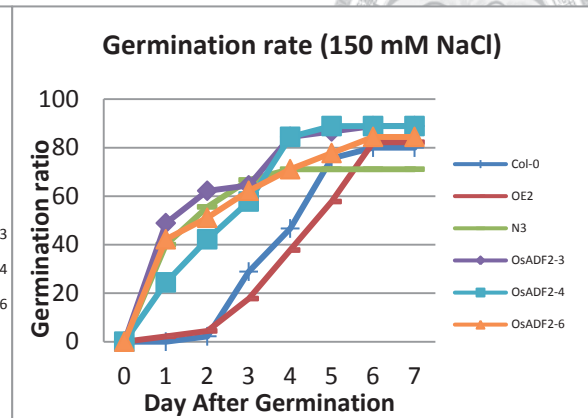
(B) (i) *35S::OsADF2* 轉殖株及 (ii) *35S::OsADF11* 轉殖株與野生型 Col-0 之抽苔時間曲線圖分析，每個基因型重複 16 棵，以分化出花芽並伸長生長者定義為已抽苔。



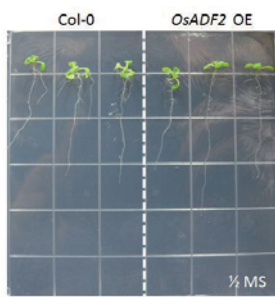
(A) (i)



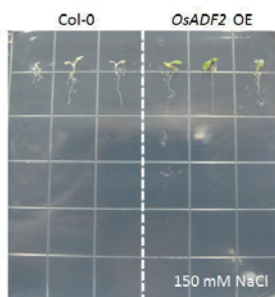
(ii)



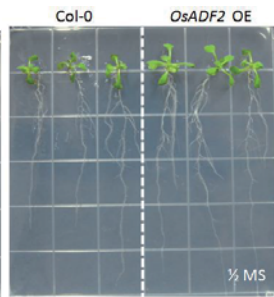
(B) (i)



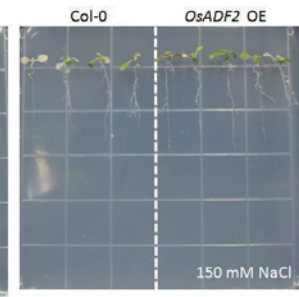
(ii)



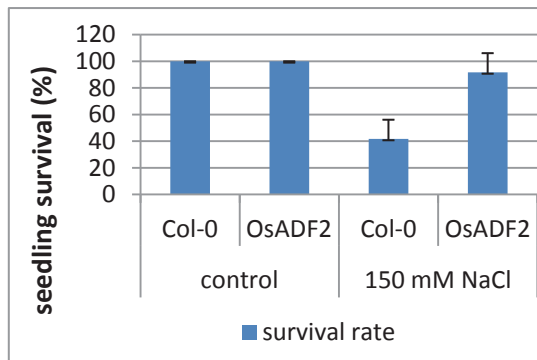
(iii)



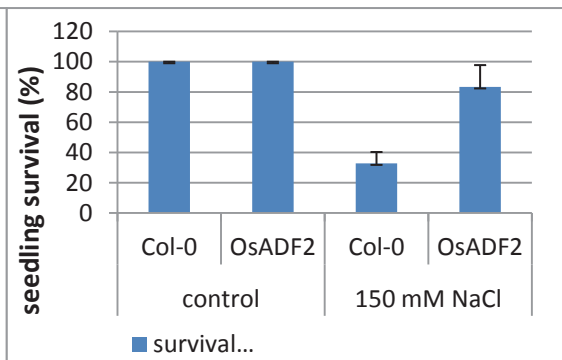
(iv)



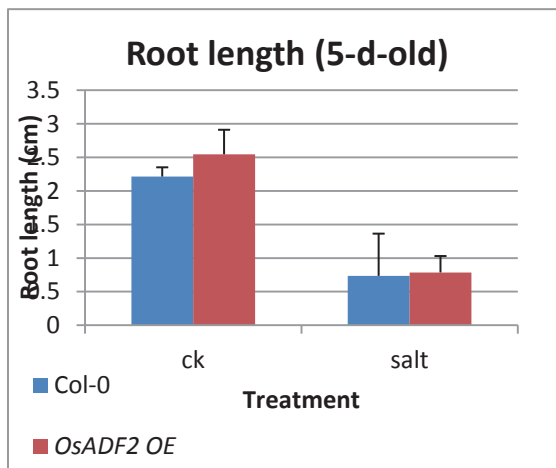
(C) (i)



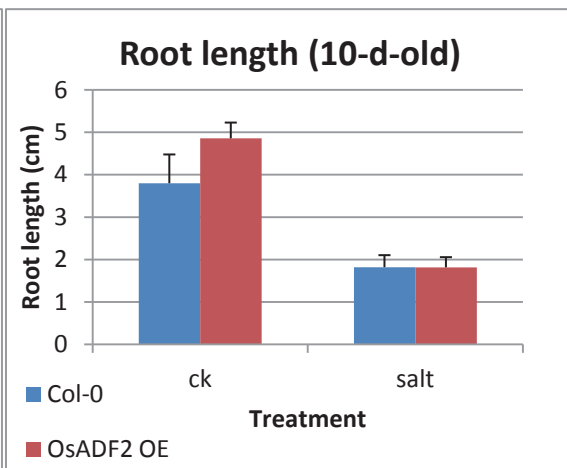
(ii)




(D) (i)

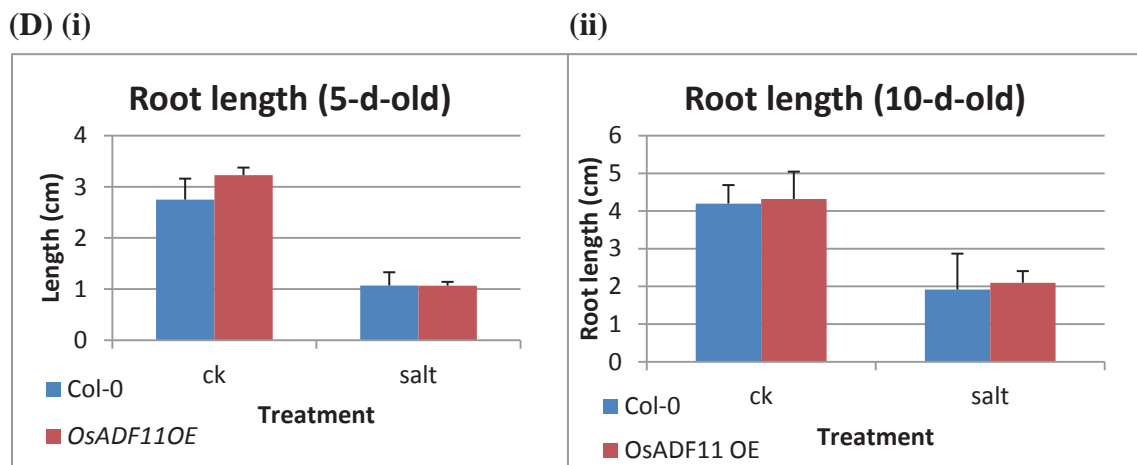
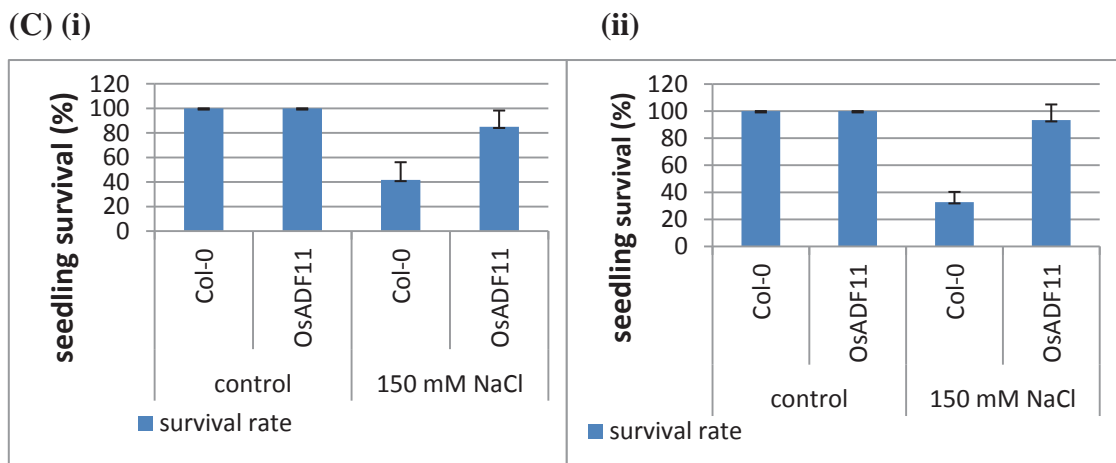
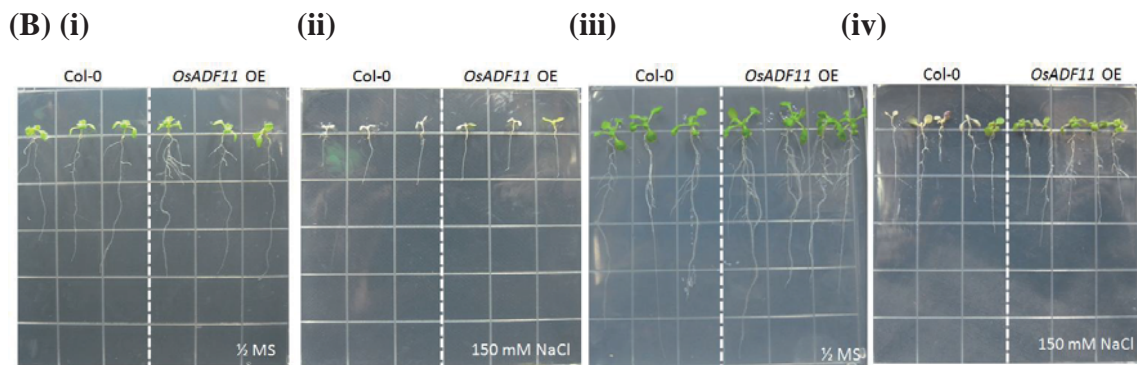
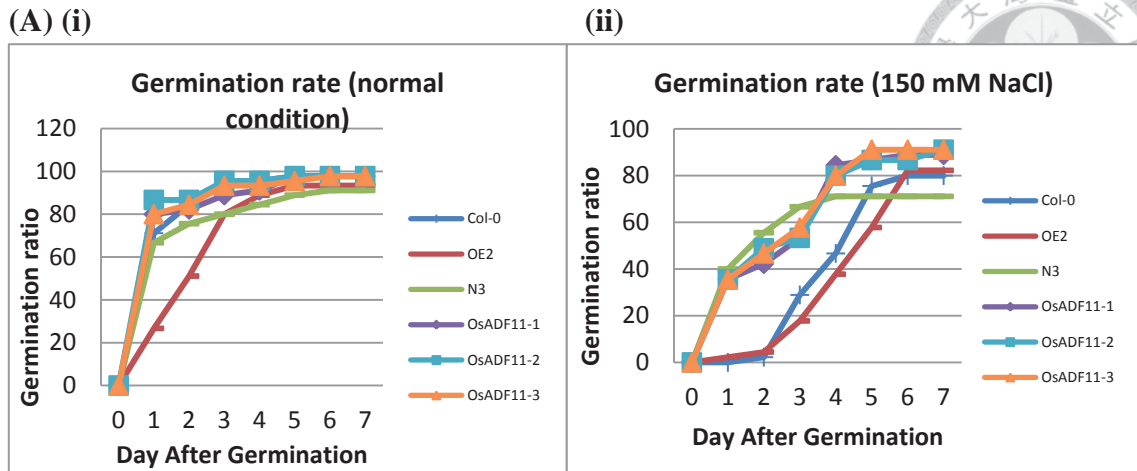


(ii)



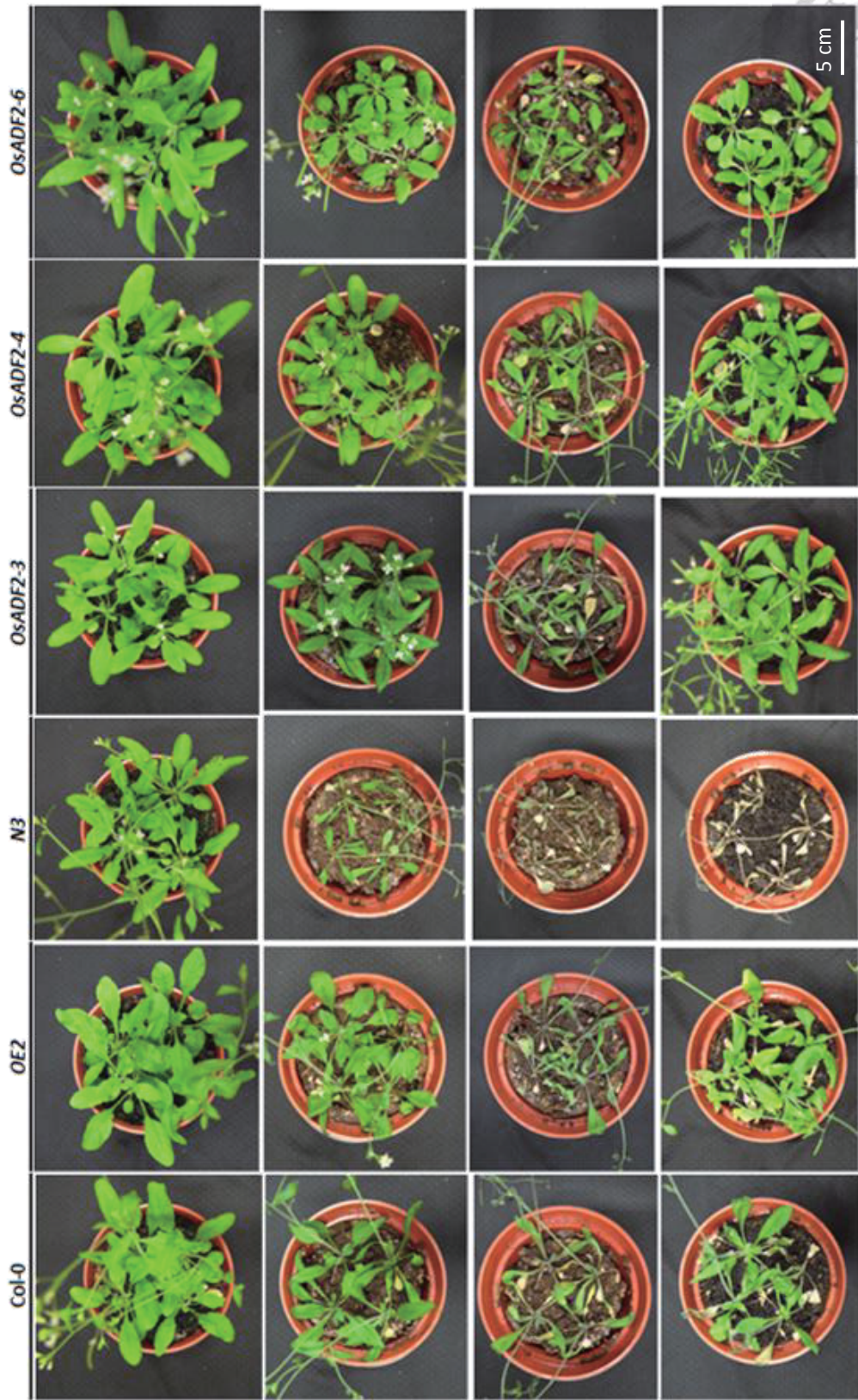
圖三、阿拉伯芥過度表現水稻 *OsADF2* 於逆境下之觀察

- 
- (A) 於 (i) 1/2 MS (ii) 150 mM NaCl + 1/2 MS 培養基對野生型阿拉伯芥 Col-0 及 *OsADF2* 轉殖株進行發芽率測試
- (B) 將 5 天大之野生型阿拉伯芥 Col-0 及 *OsADF2* 轉殖株由 1/2 MS 培養基移植至含有 (i) 1/2 MS (ii) 150 mM NaCl + 1/2 MS 培養基培養 4 天之結果觀察。將 10 天大之野生型阿拉伯芥 Col-0 及 *OsADF2* 轉殖株由 1/2 MS 培養基移植至含有 (iii) 1/2 MS (iv) 150 mM NaCl + 1/2 MS 培養基培養 4 天之結果觀察。
- (C) (i) 5 天大之野生型阿拉伯芥 Col-0 及 *OsADF2* 轉殖株由 1/2 MS 培養基移植至含 1/2 MS 或 150 mM NaCl + 1/2 MS 培養基培養 4 天之存活率結果。
(ii) 10 天大之野生型阿拉伯芥 Col-0 及 *OsADF2* 轉殖株由 1/2 MS 培養基移植至含 1/2 MS 或 150 mM NaCl + 1/2 MS 培養基培養 4 天之存活率結果。
- (D) (i) 將 5 天大之野生型阿拉伯芥 Col-0 及 *OsADF2* 轉殖株由 1/2 MS 培養基移植至含有 1/2 MS 及 150 mM NaCl + 1/2 MS 培養基培養 4 天之根長分析。(ii) 將 10 天大之野生型阿拉伯芥 Col-0 及 *OsADF2* 轉殖株由 1/2 MS 培養基移植至含有 1/2 MS 及 150 mM NaCl + 1/2 MS 培養基培養 4 天之根長分析。



圖四、阿拉伯芥過度表現水稻 *OsADF11* 之於逆境下根長分析與存活率分析

- (A) 於 (i) 1/2 MS (ii) 150 mM NaCl + 1/2 MS 培養基對野生型阿拉伯芥 Col-0 及 *OsADF11* 轉殖株進行發芽率測試
- (B) 將 5 天大之野生型阿拉伯芥 Col-0 及 *OsADF11* 轉殖株由 1/2 MS 培養基移植至含有 (i) 1/2 MS (ii) 150 mM NaCl + 1/2 MS 培養基培養 4 天之結果觀察。將 10 天大之野生型阿拉伯芥 Col-0 及 *OsADF11* 轉殖株由 1/2 MS 培養基移植至含有 (iii) 1/2 MS (iv) 150 mM NaCl + 1/2 MS 培養基培養 4 天之結果觀察。
- (C) (i) 5 天大之野生型阿拉伯芥 Col-0 及 *OsADF11* 轉殖株由 1/2 MS 培養基移植至含 1/2 MS 或 150 mM NaCl + 1/2 MS 培養基培養 4 天之存活率結果。
(ii) 10 天大之野生型阿拉伯芥 Col-0 及 *OsADF11* 轉殖株由 1/2 MS 培養基移植至含 1/2 MS 或 150 mM NaCl + 1/2 MS 培養基培養 4 天之存活率結果。
- (D) (i) 將 5 天大之野生型阿拉伯芥 Col-0 及 *OsADF11* 轉殖株由 1/2 MS 培養基移植至含有 1/2 MS 及 150 mM NaCl + 1/2 MS 培養基培養 4 天之根長分析。(ii) 將 10 天大之野生型阿拉伯芥 Col-0 及 *OsADF11* 轉殖株由 1/2 MS 培養基移植至含有 1/2 MS 及 150 mM NaCl + 1/2 MS 培養基培養 4 天之根長分析。



Control

Drought (7d)

67

Drought (12d)

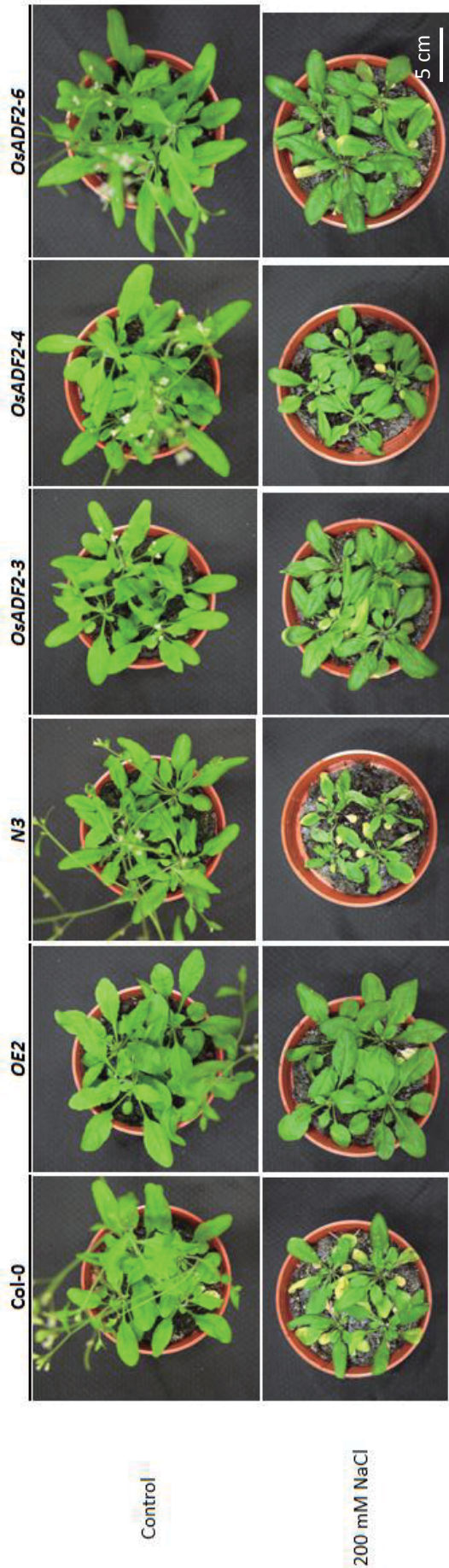
Re-watering (5d)



圖五、35S::*OsADF2* 轉殖株成株之乾旱逆境觀察

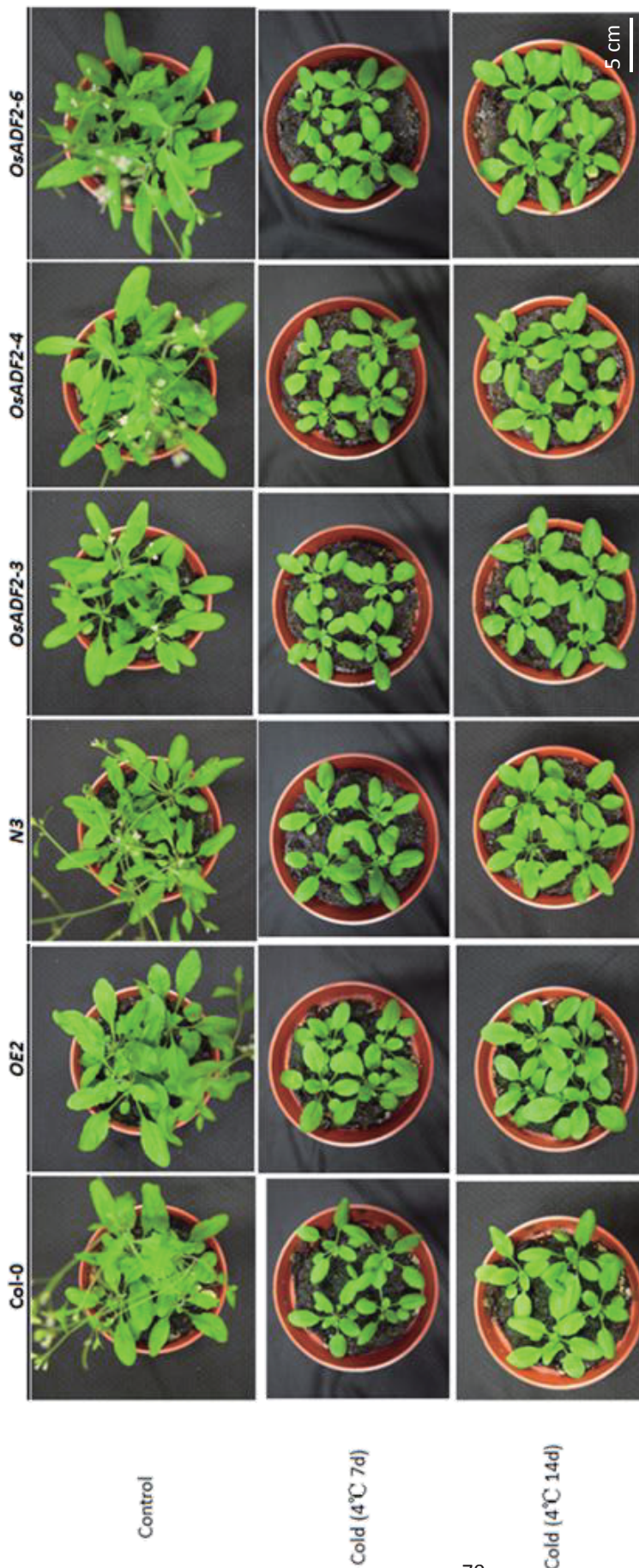
以乾旱逆境處理 21 天之阿拉伯芥野生型 (Col-0)、35S::*OsADF2* 轉殖株 (品系#3、#4、#6) 及正負控制組 35S::*LfNCED3* (OE2)、*atnced3* (N3) 外表型。實驗控制組 (Control) 為正常澆灌自來水，乾旱逆境 (Drought) 處理為 21 天後停止給水，持續觀察至停止給水持續 12 天後開始復水。



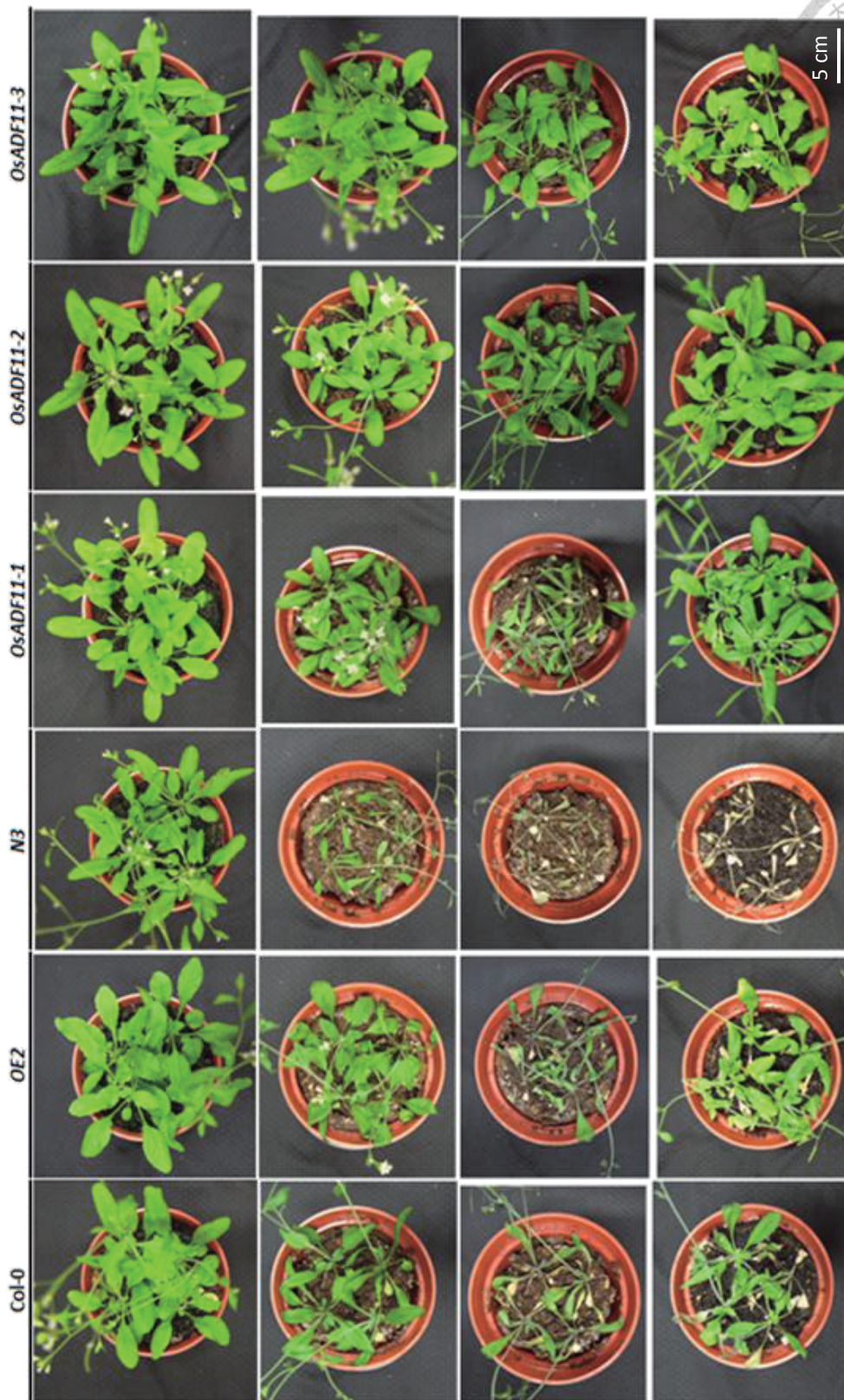


圖六、*35S::OsADF2* 轉殖株成株之高鹽逆境觀察

以高鹽逆境處理 21 天之阿拉伯芥野生型 (Col-0) 、*35S::OsADF2* 轉殖株 (品系#3、#4、#6) 及正負控制組 *35S::LfnCED3* (*OE2*) 、*atnced3* (*N3*) 外表型。實驗控制組 (Control) 為正常澆灌自來水，高鹽逆境處理為以 200 mM NaCl 處理，自種植 21 天後與控制組同時給予含 200 mM NaCl 之水澆灌。



圖七、35S::*OsADF2* 轉植株成株之低溫逆境觀察
 以低溫逆境處理 21 天之阿拉伯芥野生型 (Col-0)、35S::*OsADF2* 轉植株 (品系 #3、#4、#6) 及正負控制組 35S::*LfNCED3* (OE2)、*atnced3* (N3) 外表型。實驗控制組 (Control) 為正常溫度培養，低溫逆境 (Cold) 為轉移至低溫生長箱以 4°C 處理，持續處理 14 天後回復室溫培養。



Control

Drought (7d)

Drought (12d)

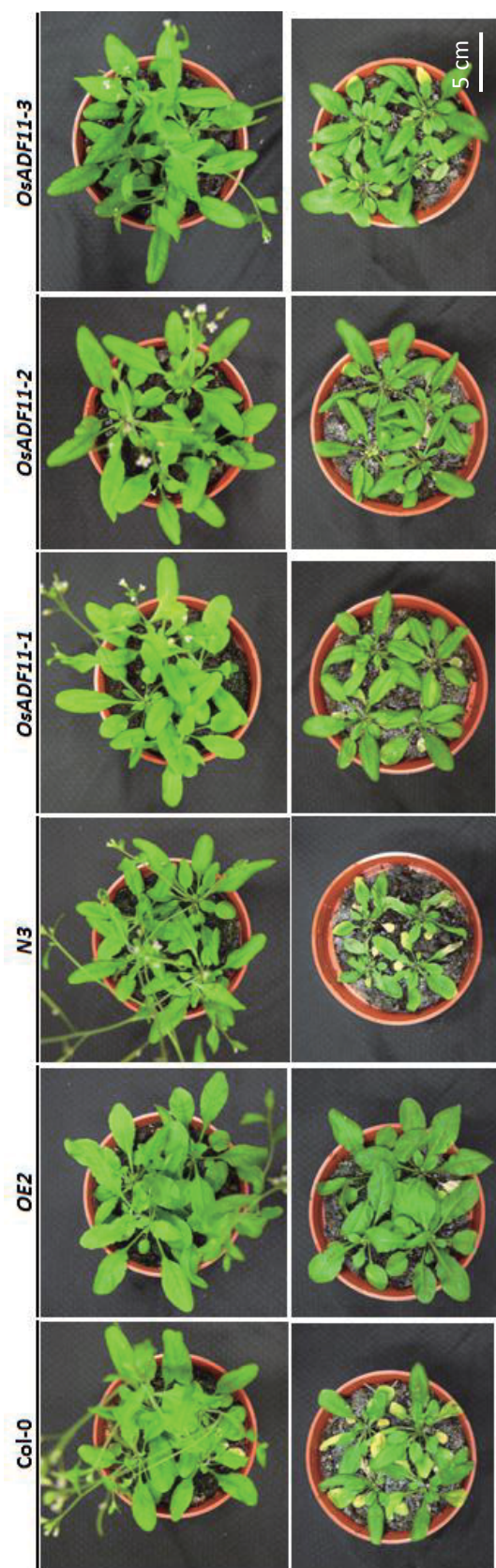
Re-watering (5d)



圖八、35S::OsADF11 轉殖株成株之乾旱逆境觀察

以不同逆境處理 21 天之阿拉伯芥野生型 (Col-0)、35S::OsADF11 轉殖株 (品系#1、#2、#3) 及正負控制組 35S::LfNCED3 (OE2)、atnced3 (N3) 外表型。實驗控制組 (Control) 為正常澆灌自來水，乾旱逆境 (Drought) 處理為 21 天後停止給水，持續觀察至停止給水持續 12 天後開始復水。



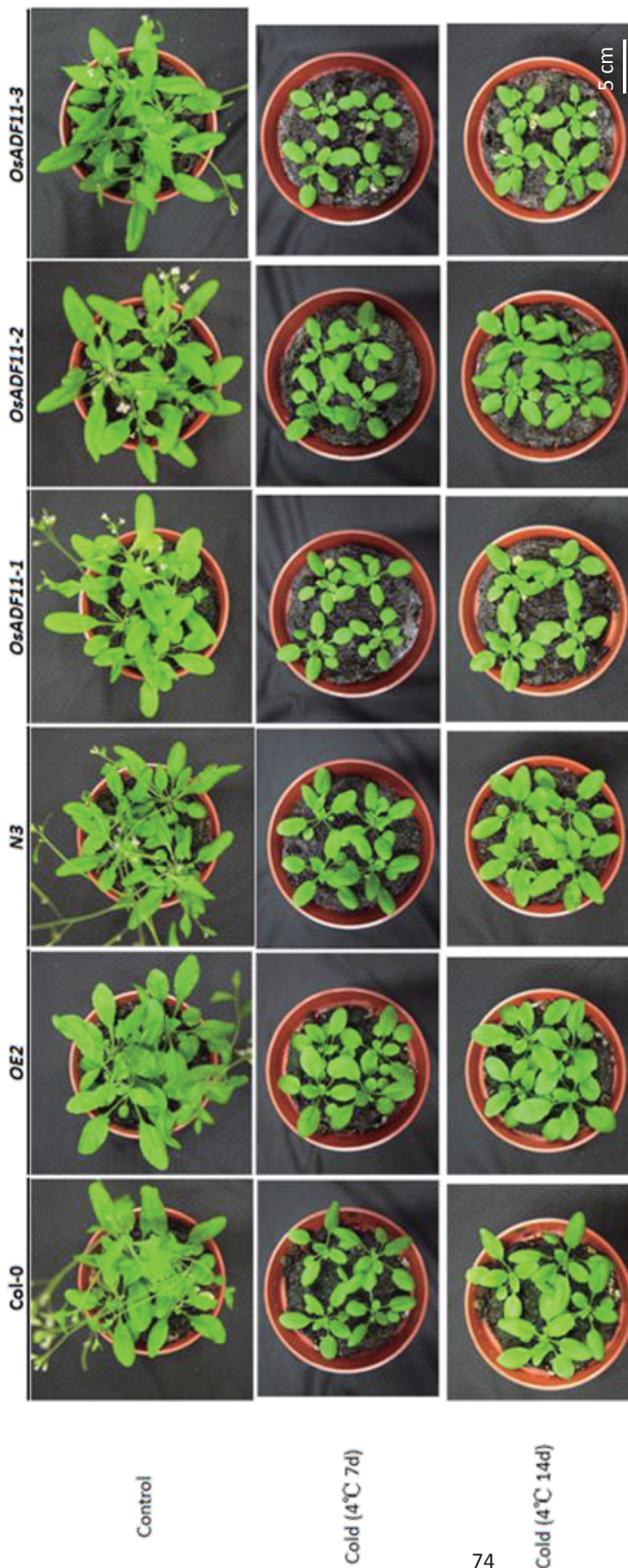


圖九、*35S::OsADF11* 轉殖株成株高鹽之逆境觀察

以不同逆境處理 21 天之阿拉伯芥野生型 (Col-0)、*35S::OsADF11* 轉殖株 (品系#1、#2、#3) 及正負控制組 *35S::LjNCED3* (OE2)、*atnced3* (N3) 外表型。實驗控制組 (Control) 為正常澆灌自來水，高鹽逆境處理為以 200 mM NaCl 處理，自種植 21 天後與控制組同時給予含 200 mM NaCl 之水澆灌。

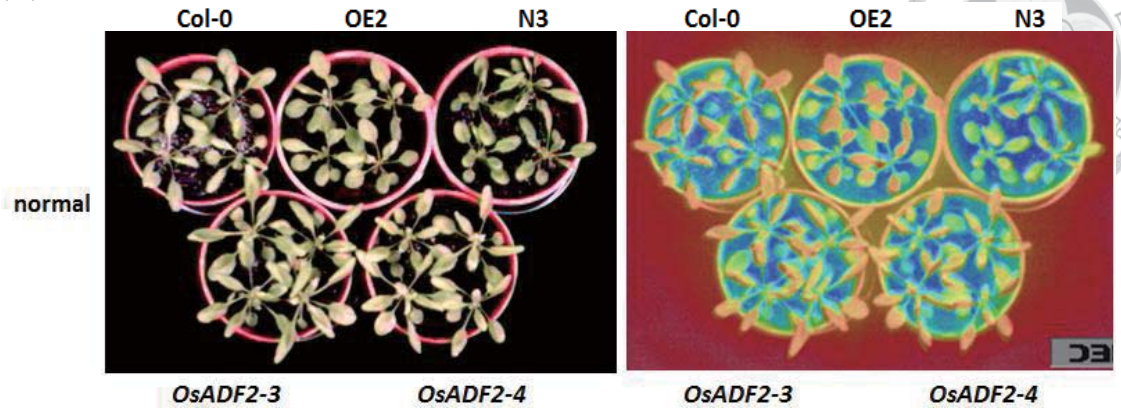
Control

200 mM NaCl

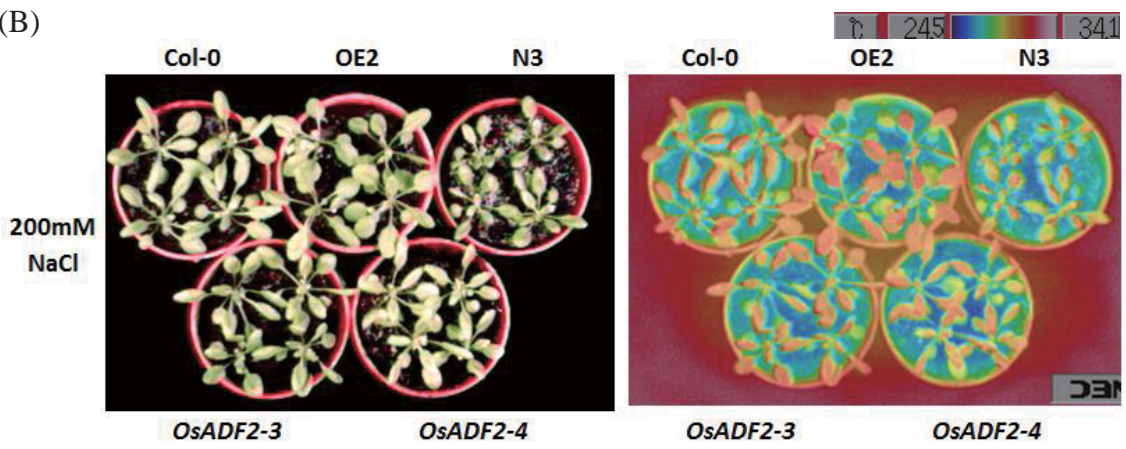


圖十、35S::*OsADF11* 轉殖株成株之低溫逆境觀察
以不同逆境處理 21 天之阿拉伯芥野生型 (Col-0)、35S::*OsADF11* 轉殖株 (品系#1、#2、#3) 及正負控制組 35S::*LfNCED3* (OE2)、*atnced3* (N3) 外表型。實驗控制組 (Control) 為正常溫度下培養，低溫逆境 (Cold) 為轉移至低溫生長箱以 4°C 處理，持續處理 14 天後回復室溫培養。

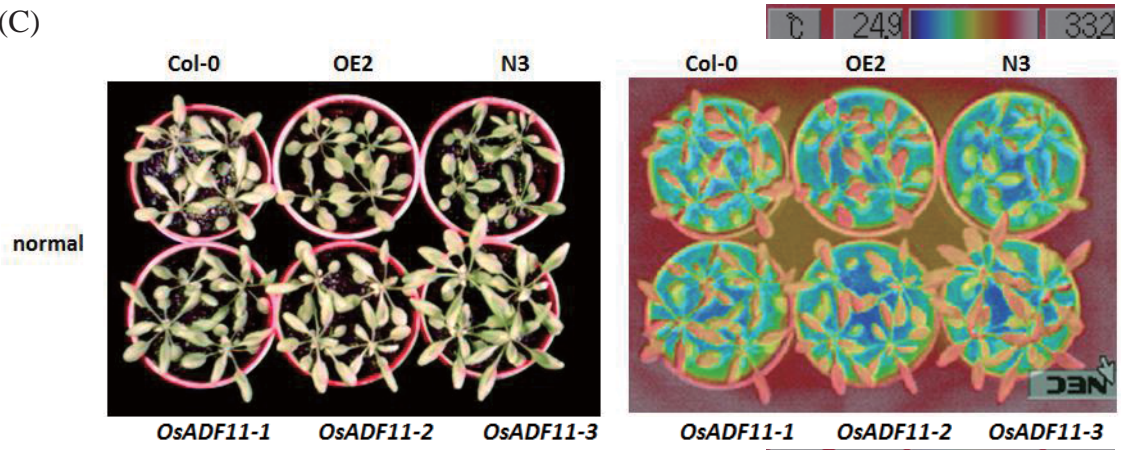
(A)



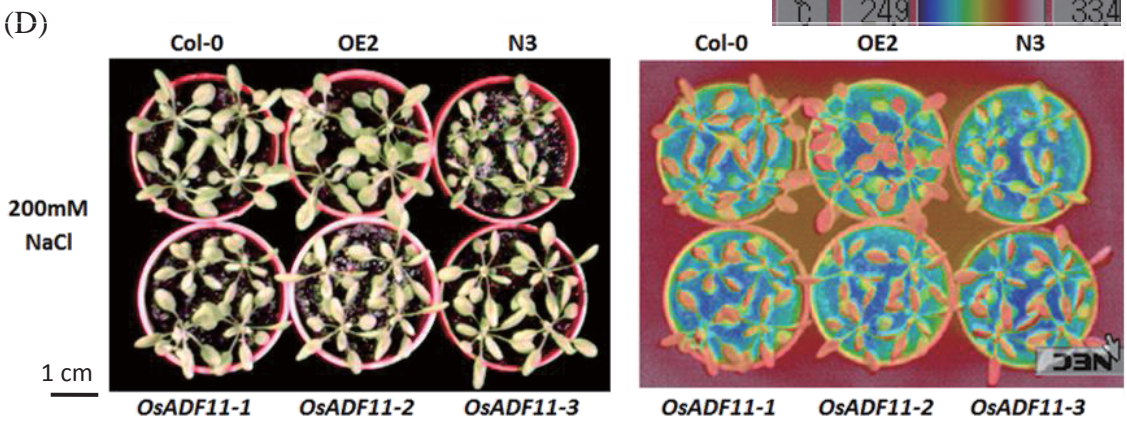
(B)



(C)

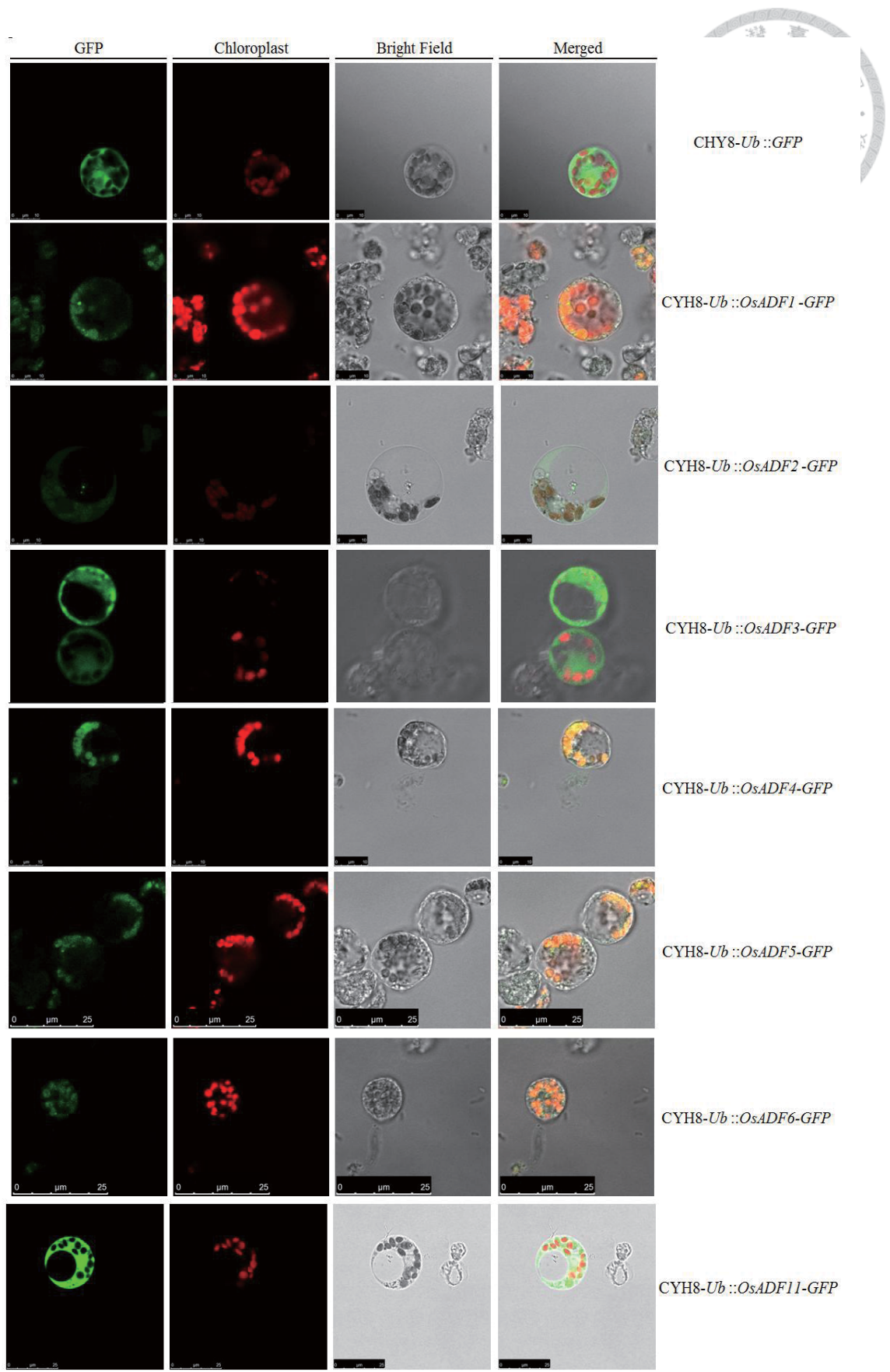


(D)



圖十一、紅外線熱感應影像分析阿拉伯芥過度表現水稻 *OsADF2* 及 *OsADF11* 轉殖株於 200mM NaCl 處理之鹽份逆境下反應

- (A) 以紅外線熱感應影像分析一般環境下野生型 Col-0、*OsADF2* 轉殖株以及控制組 35S::*LfNCED3* 及 *atnced3* 突變株之葉片溫度。
- (B) 以紅外線熱感應影像分析以 200mM NaCl 處理 24 小時之野生型 Col-0、*OsADF2* 轉殖株以及控制組 35S::*LfNCED3* 及 *atnced3* 突變株之葉片溫度。
- (C) 以紅外線熱感應影像分析一般環境下野生型 Col-0、*OsADF11* 轉殖株以及控制組 35S::*LfNCED3* 及 *atnced3* 突變株之葉片溫度。
- (D) 以紅外線熱感應影像分析以 200mM NaCl 處理 24 小時之野生型 Col-0、*OsADF2* 轉殖株以及控制組 35S::*LfNCED3* 及 *atnced3* 突變株之葉片溫度。
- 圖片中顏色越趨近於藍色者代表溫度越低，反之越接近紅色者表示溫度越高。

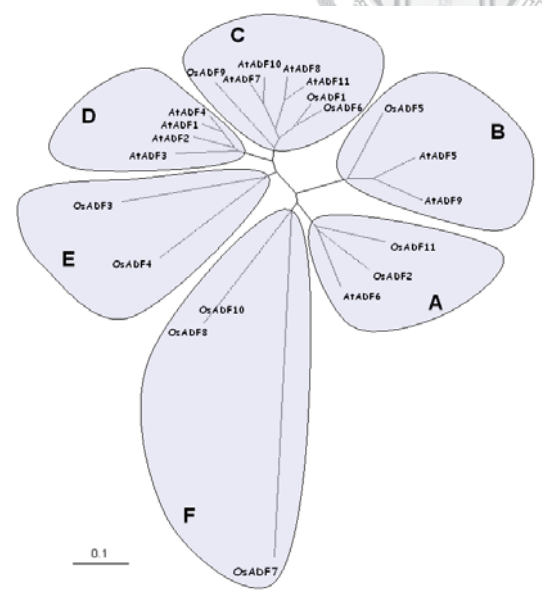
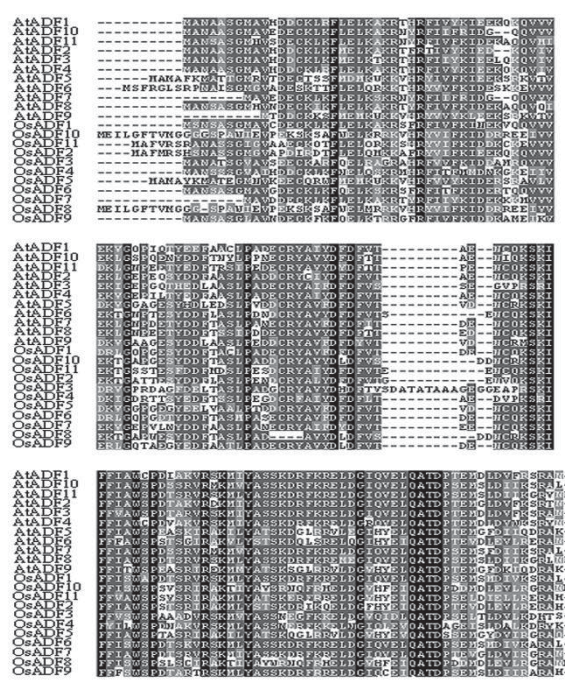


圖十二、水稻 *OsADFs* 基因家族之 GFP 融合蛋白於水稻原生質體之次細胞定位
對照組為 *CYH8-Ub::GFP*，表現於細胞之細胞質及細胞核中。
GFP：GFP 螢光視野，Chloroplast：葉綠體螢光螢光視野，Bright field：可見光視
野，Merged：可見光、GFP 與葉綠體螢光視野。Bars = 25 μ m。



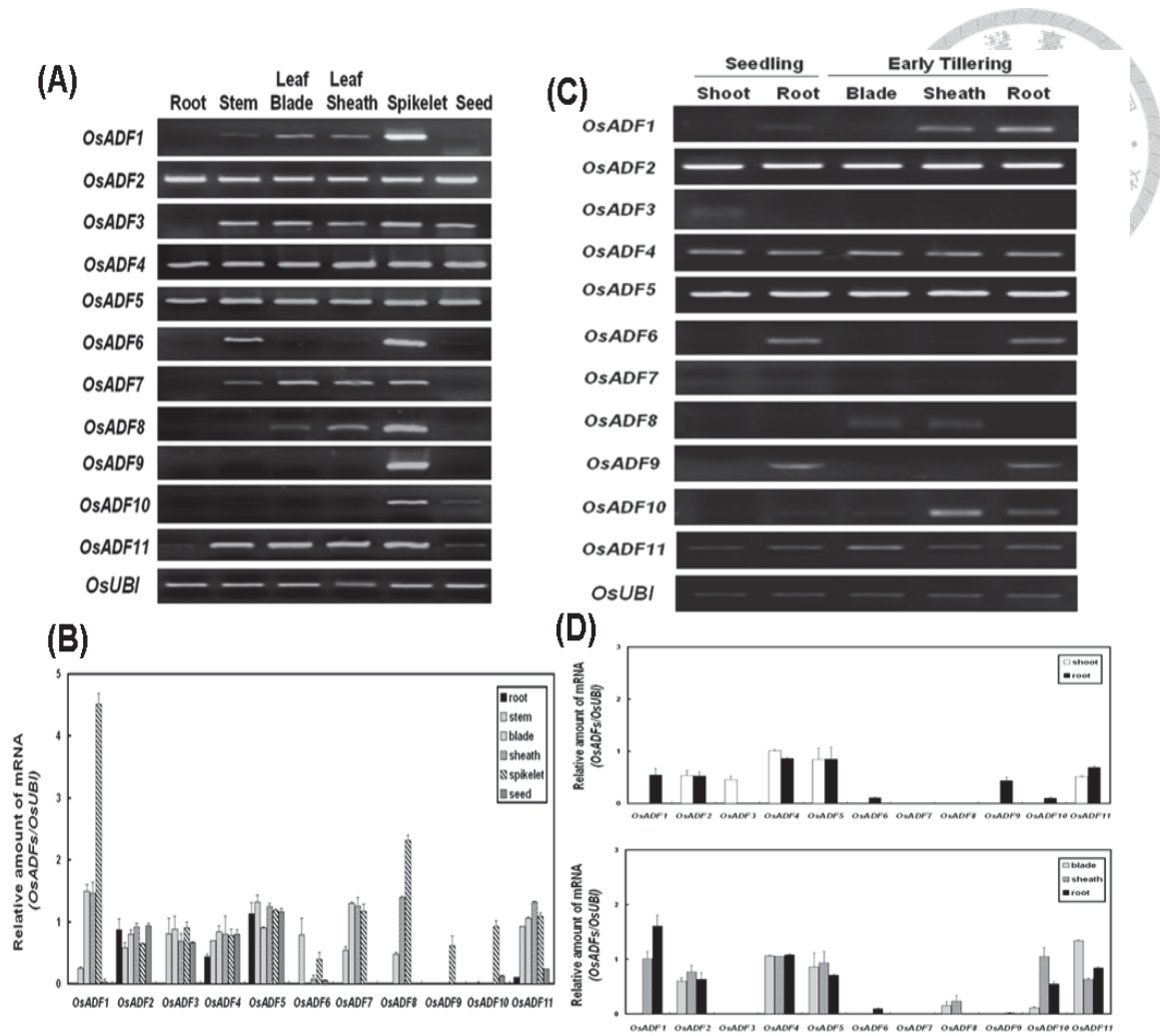


(A) (B)



附錄一、 水稻和阿拉伯芥之肌動蛋白去聚合因子家族胺基酸的序列比對分析及親緣演化樹分析

(A) 水稻和阿拉伯芥之肌動蛋白去聚合因子家族胺基酸的序列比對，以灰底白字表示相似胺基酸。黑底白字表示相同胺基酸。水稻 OsADF isoform 間序列相似度最接近者分別為 OsADF8 和 OsADF10 (94%)，OsADF1 和 OsADF6 (90%)，OsADF1 和 OsADF9 (78%)，OsADF6 和 OsADF9 (77%)，OsADF2 和 OsADF11 (77%)。(B) 水稻與阿拉伯芥肌動蛋白去聚合因子家族基因之親緣演化樹，使用 CLUSTAL W 1.83 軟體與 Treeview 軟體，再以 powerpoint 將其分群繪製。最小的 bootstrap 設定為 700。水稻與阿拉伯芥家族基因的親緣演化樹可分為六 6 群: A 群 (OsADF11, OsADF2 和 AtADF6)，B 群 (OsADF5, AtADF5 和 AtADF9)，C 群 (OsADF9; AtADF7, 8, 10, 11; OsADF1 和 OsADF6)，D 群 (AtADF1, 2, 3 和 4)，E 群 (OsADF3 和 OsADF4) 和 F 群 (OsADF10, 8 和 7) (Huang *et al.*, 2012)。

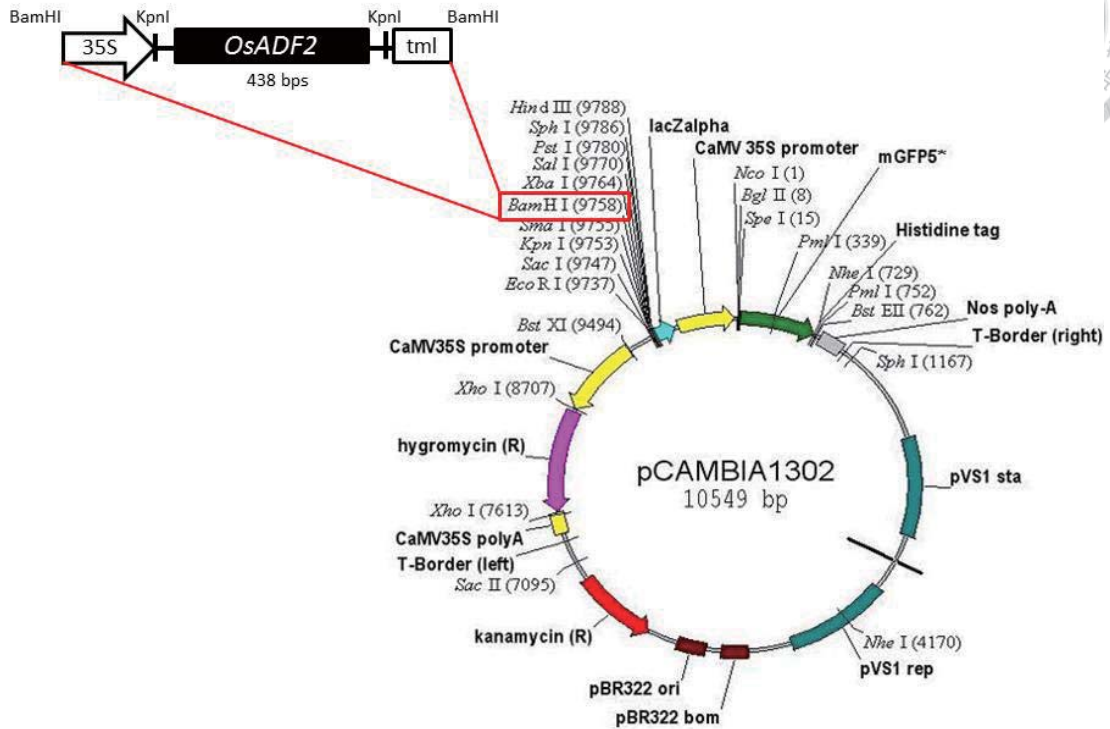


附錄二、 水稻肌動蛋白去聚合因子家族基因於不同組織與生長期之表現圖譜分析

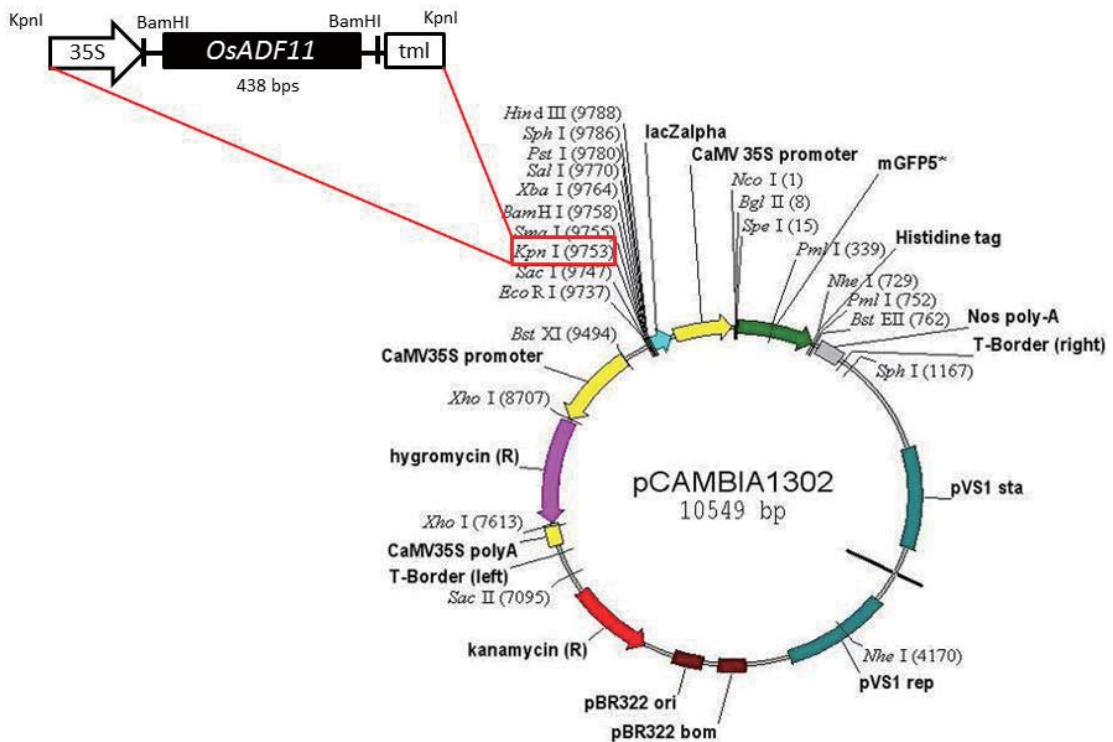
水稻肌動蛋白去聚合因子家族基因於不同組織與生長期之表現圖譜分析。(A)水稻台農 67 號之根，莖，葉身，葉鞘與花穗於抽穗時期之 OsADF 家族基因的表現圖譜。(B)為(A)的量化圖 (C)水稻台農 67 號幼苗期與早期分蘗階段之不同部位之 OsADF 家族基因的表現圖譜。(D)為(C)的量化圖。RT-PCR 以 *OsUBI* (D12629) 作為 internal control 基因。Bars show means \pm SE (n = 3) (Huang *et al.*, 2012)。



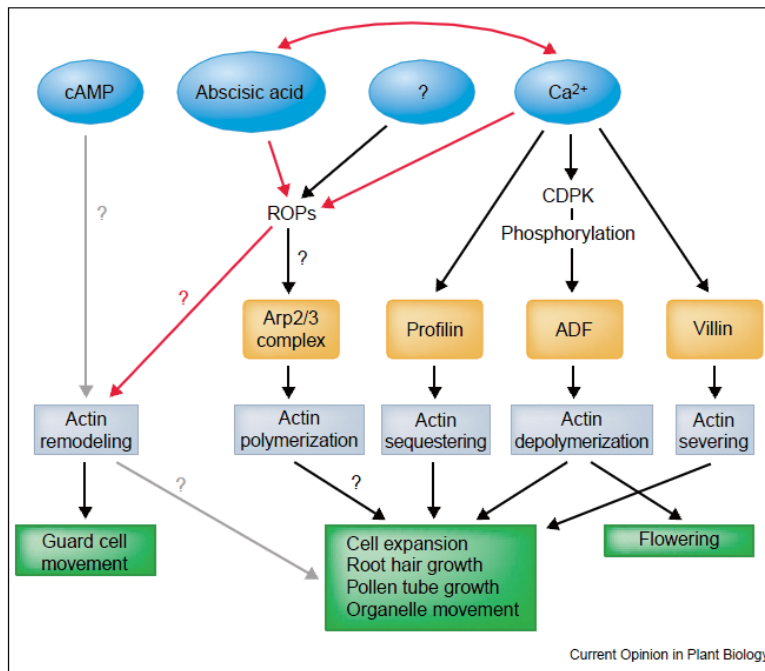
(A) 穩定表現 35S::*OsADF2* 基因載體之構築



(B) 穩定表現 35S::*OsADF11* 基因載體之構築

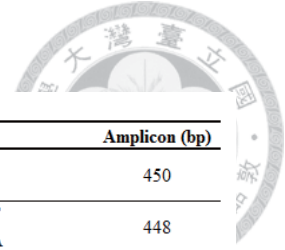


附錄三、 基因轉殖表現載體構築之質粒圖



Current Opinion in Plant Biology

附錄四、 訊息傳遞分子與植物肌動蛋白骨架之關聯圖 (Marylin *et al.*, 2002)



附錄五、 本研究所使用之引子對一覽

水稻肌動蛋白去聚合因子基因家族(*OsADF*s)成員轉殖株所使用的專一性引子對

Gene name	Primer Name	Primer Sequence (5'→3')	Amplicon (bp)
<i>OsADF2</i>	OsADF2_KpnI_Fw	GGTACCATGGCGTTCATGCGTCCCA	450
	OsADF2_KpnI_Rv	ACTAGTTAATGAGCCCGCTCCCGGA	
<i>OsADF5</i>	OsADF5_BamHI_Fw	CGGGATCCATGGCAATGGCTTACAAGAT	448
	OsADF5_BamHI_Rv	CGGGATCCTCACTGAGCGCGGCCTCGGA	
<i>OsADF11</i>	OsADF11_BamHI_Fw	CGGGATCCATGGCATTGTCAGATCACG	454
	OsADF11_BamHIRv	CGGGATCCTCAATGAGCACGCTCTCTAA	

水稻肌動蛋白去聚合因子基因家族(*OsADF*s)成員RT-PCR所使用的專一性引子對

Gene name	Primer Name	Primer Sequence (5'→3')	Amplicon (bp)
<i>OsADF2</i>	RT_OsADF2_Fw	GTTCCCACTCCAATGCATCC	378
	RT_OsADF2_Rv	CGGTTGCCTGGATCTCGTAG	
<i>OsADF11</i>	RT_OsADF11_Fw	AATCGGTGTAGTCCCGAGT	333
	RT_OsADF11_Rv	TGCACACCATCCAGCTCTCT	

水稻肌動蛋白去聚合因子基因家族(*OsADF*s)成員次細胞定位所使用的專一性引子對

Gene name	Primer Name	Primer Sequence (5'→3')	Amplicon (bp)
<i>OsADF1</i>	F-SmaI-OsADF1-CDS-HindIII(C-fusion)	CCCGGGATGTCGAATTCGGCGTCGGGAATG	432
	R-SmaI-OsADF1-CDS-HindIII(C-fusion)	AAGCTTGAGGGCTCGCGACTTGACGATGTC	
<i>OsADF2</i>	F-SmaI-OsADF2-CDS-HindIII(C-fusion)	CCCGGGATGGCGTTTCATGCGTTCCCACTCC	450
	R-SmaI-OsADF2-CDS-HindIII(C-fusion)	AAGCTTATGAGCCCGCTCCCGGAGGACCTC	
<i>OsADF3</i>	F-SmaI-OsADF3-CDS-HindIII(C-fusion)	CCCGGGATGGCGAACGCGACGTCGGGTGTG	465
	R-SmaI-OsADF3-CDS-HindIII(C-fusion)	AAGCTTGAGGTGTGGTCCCTGAGCACGTC	
<i>OsADF4</i>	F-SmaI-OsADF4-CDS-HindIII(C-fusion)	CCCGGGATGGCAAATTCATCATCTGGAGTTGC	432
	R-SmaI-OsADF4-CDS-HindIII(C-fusion)	AAGCTTTTTCACACGATCTTTGAGCGCATC	
<i>OsADF5</i>	F-SmaI-OsADF5-CDS-HindIII(C-fusion)	CCCGGGATGGCAATGGCTTACAAGATGGCG	444
	R-SmaI-OsADF5-CDS-HindIII(C-fusion)	AAGCTTCTGAGCGCGGCCTCGGATGACGTC	
<i>OsADF6</i>	F-SmaI-OsADF6-CDS-HindIII(C-fusion)	CCCGGGATGGCGAACTCAGCGTCGGGGATG	432
	R-SmaI-OsADF6-CDS-HindIII(C-fusion)	AAGCTTGAGGGCTCTCGCTTTGACGATGTC	
<i>OsADF7</i>	F-SmaI-OsADF7-CDS-HindIII(C-fusion)	CCCGGGATGTTGTTATTAATATTTATGCG	438
	R-SmaI-OsADF7-CDS-HindIII(C-fusion)	AAGCTTACATTGCTCGTTACATATATTAATATTG	
<i>OsADF9</i>	F-SmaI-OsADF9-CDS-HindIII(C-fusion)	CCCGGGATGGCGCTTATCCCGTCGCTGGCC	432
	R-SmaI-OsADF9-CDS-HindIII(C-fusion)	AAGCTTCAAGGCACTGCTGTCTTTCCGGGC	
<i>OsADF10</i>	F-SmaI-OsADF10-CDS-HindIII(C-fusion)	CCCGGGATGGAGATCTTGATTCACTGTTATG	468
	R-SmaI-OsADF10-CDS-HindIII(C-fusion)	AAGCTTGGTTCTATTAGCACGGCCCTGAG	
<i>OsADF11</i>	F-SmaI-OsADF11-CDS-HindIII(C-fusion)	CCCGGGATGGCATTGTCAGATCACGCGCAAATG	450
	R-SmaI-OsADF11-CDS-HindIII(C-fusion)	AAGCTTATGAGCACGCTCTCTAAGAAGCTC	
<i>GFP</i>	F-HindIII-GFP-SpeI-AvrII (N-fusion)	AAGCTTATGGTGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG	738
	R-HindIII-GFP-SpeI-AvrII (N-fusion)	CCTAGGACTAGTCTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGTG	

附錄六、 與肌動蛋白相關之研究整理

Species	Gene	Function	Expression location	Reference
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>AtADF1</i>	Control of actin organization, flowering time	All organs of mature plants	Dong <i>et al.</i> , 2013
	<i>AtADF4</i>	Resistance of <i>Pseudomonas syringae</i>		Tian <i>et al.</i> , 2009
	<i>AtADF5</i>	Regulation of the actin cytoskeleton	All organs (low levels in leaves, flowers and siliques)	Dong <i>et al.</i> , 2001
	<i>AtADF6</i>	Regulation of the actin cytoskeleton	All organs of mature plants.	Dong <i>et al.</i> , 2001
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>GhADF7</i>	Involved in F-actin dynamics in flower tissues	-	Li <i>et al.</i> , 2009
<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>NtADF1</i>	Pollen tube growth, actin dynamics.	-	Chen <i>et al.</i> , 2003
	<i>NtADF2</i>	Involved in Auxin-dependent cell division.	-	Steffen Durs <i>et al.</i> , 2013
<i>Oryza sativa</i>	<i>OsADF3</i>	Improve plant drought and osmotic stresses tolerance	The nucleus	Huang <i>et al.</i> , 2012
<i>Triticum aestivum</i>	<i>TaADF</i>	Specific induced by cold	-	Oullet <i>et al.</i> , 2001
<i>Zea mays</i>	<i>ZmADF1</i>	Cause the reorganisation of the actin cytoskeleton	Pollen	Hussey <i>et al.</i> , 1998
	<i>ZmADF2</i>		Pollen	Jiang <i>et al.</i> , 1997b
	<i>ZmADF3</i>	Modulate actin depolymerising activity Binds to PIP ₂ -> inhibit PLC breakdown PIP ₂	Every tissue except pollen	Jiang <i>et al.</i> , 1997a

Stress	Species	Gene	Function	Reference
Salt Stress	<i>Arabidopsis</i>	Actin-related protein 2/3 complex <i>PKS5</i>	Regulate Mitochondrial-Associated Calcium Signaling stabilizing microfilament, and increase the alkaline tolerance	Zhao <i>et al.</i> , 2013 Li <i>et al.</i> , 2011
	<i>Thellungiella salsuginea</i>	<i>TsDHN</i>	Facilitates cation-induced conformational changes and actin assembly.	
Stress	Species	Treatment	Result	Reference
Salt Stress	<i>Arabidopsis</i>	Disrupted actin dynamics	Increment ROS levels in root more tolerance more sensitive	Liu <i>et al.</i> , 2012
		AF stabilizer (phalloidin)		Wang <i>et al.</i> , 2008
		AF destabilizer (LatB)		Wang <i>et al.</i> , 2009

