

國立臺灣大學生命科學院植物科學研究所



碩士論文

Graduate Institute of Plant Biology

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

阿拉伯芥 *GASA4* 在光及荷爾蒙交互作用中的功能性
研究

Functional Studies of *GASA4* in Light and the Integration
of Hormone Signalings in *Arabidopsis*

蔡旻潔

Ming-Chieh Tsai

指導教授：謝旭亮 博士

Advisor: Dr. Hsu-Liang Hsieh

中華民國一百零二年七月

July, 2013



國立臺灣大學碩士學位論文

口試委員會審定書

阿拉伯芥 *GASA4* 在光及荷爾蒙交互作用中的
功能性研究

Functional Studies of *GASA4* in Light and the Integration of Hormone Signalings in *Arabidopsis*

本論文係 蔡旻潔 君 (R00B42002) 在國立臺灣大學植物
科學研究所完成之碩士學位論文，於民國 102 年 7 月 4 日承下
列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

臺灣大學植物科學研究所
謝旭亮 副教授 (指導教授)

謝旭亮

臺灣大學植物科學研究所
鄭秋萍 副教授

鄭秋萍

臺灣大學植物科學研究所
張英峯 助理教授

張英峯

臺灣大學農藝學系暨研究所
張孟基 副教授

張孟基

中央研究院植物暨微生物學研究所
趙光裕 副研究員

趙光裕



致謝

時光飛逝，在短短兩年的碩士生涯中感謝有許多人的陪伴與幫助，讓我能順利的完成學位論文。首先感謝指導教授謝旭亮老師，您總是有如此有耐心的引導我、教導我，讓我不論是在研究或思考邏輯上都能有顯著的進步。

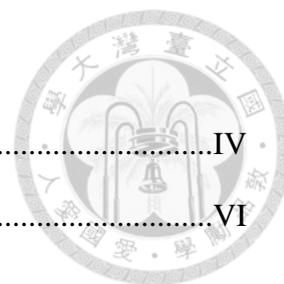
感謝口試委員鄭秋萍老師、張英峯老師、張孟基老師及趙光裕老師針對論文及後續研究所提出的寶貴意見及建議，讓我的研究能更加完善。

感謝實驗室的學長姐們，懷如、正齡、漢威、語安、揚宗、儷璘、蕭蔚及金龍，不論在研究或生活上所給我的各種幫助、建議及鼓勵。感謝同屆的蕙禎和建璋，真的很榮幸能與你們一起奮鬥到今天。此外還有實驗室的思儀、槿玟、翊郢、紫煥及佑華，祝福你們接下來的一年也能順利。

最後感謝爸爸媽媽的全力支持，成為我完成碩士學業的強大後盾。

旻潔 2013. 7. 29

目錄



中文摘要.....	IV
英文摘要.....	VI
前言	
一、緒論.....	1
二、植物的光訊息傳遞.....	2
三、吉貝素訊息傳遞.....	3
四、茉莉酸訊息傳遞.....	3
五、吉貝素與茉莉酸訊息傳遞之間的交互作用.....	5
六、GASA4.....	6
七、GASA 家族參與在不同荷爾蒙交互作用的路徑中.....	6
八、GASA4 先前的研究.....	7
九、FIN219.....	8
十、PSAK 與 NPQ4.....	9
十一、PEP carboxylase.....	10
十二、研究目標.....	10
材料與方法	
一、植物材料與生長條件.....	12
二、質體之建構與基因轉殖.....	12
三、Genomic DNA 萃取.....	13
四、下胚軸測量.....	13
五、根長測量.....	13
六、GA 促進百分比及 MeJA 抑制百分比公式.....	14
七、花青素之萃取及定量.....	14
八、葉綠素之萃取及定量.....	14



九、種子發芽測試.....	15
十、RNA 萃取與 RNA 表現量分析.....	15
十一、蛋白質萃取及表現量分析.....	15

CHAPTER I.

阿拉伯芥 GASA4 與 FIN219 之間的調控關係在吉貝素與茉莉酸訊息傳遞交互作用中的功能性研究

結果

一、GASA4 及 FIN219 會影響 JA 及 GA 相關外表型.....	17
1-1、荷爾蒙 GA 及 JA 對 <i>gasa4</i> 及 <i>fin219</i> 突變體下胚軸的影響.....	17
1-2、GASA4 與 FIN219 參與茉莉酸在弱遠紅光下促進花青素累積.....	18
1-3、FIN219 在各種不同的 MeJA 濃度下均具有對 JA 不敏感的根長外表型.....	18
1-4、GASA4 與 FIN219 參與吉貝素促進種子萌發.....	19
二、GASA4 與 FIN219 會彼此調控對方的表現.....	19
三、GASA4 及 FIN219 共同調控 JA 相關基因的表現.....	20
3-1、JA 生合成基因.....	20
3-2、JA 訊息傳遞因子.....	21
四、GASA4 及 FIN219 共同調控 GA 相關基因表現.....	21
4-1、DELLA 基因.....	22
4-2、SPY 基因.....	22

討論

一、GASA4 與 FIN219 共同參與在吉貝素訊息傳遞路徑.....	23
二、GASA4 與 FIN219 共同參與在茉莉酸訊息傳遞路徑.....	23
三、GASA4 能藉由多條路徑調控 GA 與 JA 訊息傳遞的交互作用.....	24
四、遠紅光的強弱會造成對 GA 及 JA 反應的影響不同.....	25
五、結論與未來展望.....	27



CHAPTER II.

阿拉伯芥 *GASA4* 在紅外光訊息傳遞中的功能性研究

結果

- 一、PSAK 大量表現轉殖株在紅外光照射下呈現長下胚軸的外表型.....29
- 二、NPQ4 大量表現的轉殖株在紅外光照射下同樣呈現長下胚軸的外表型.....29
- 三、在 *gasa4* 突變株背景下的轉殖株會恢復成如同野生型的外表型.....30
- 四、紅外光能促進 C4 植物 *PEPC* 基因的表現.....30
- 五、紅外光能影響葉綠素含量.....31

討論

- 一、PSAK、NPQ4 及 *GASA4* 共同參與紅外光抑制下胚軸延長的路徑中.....32
- 二、紅外光照射能促進植物的光合作用效率.....32
- 三、紅外光照射能延緩植物葉的老化.....33

結果圖表.....34

參考文獻.....52

附錄一：實驗詳細流程.....58

附錄二：使用之引子列表.....61

中文摘要

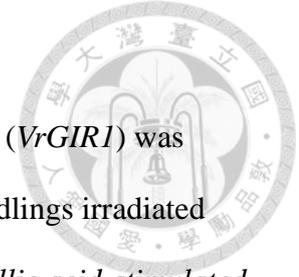


先前利用差異表現法篩選到在綠豆中會受 3-5 μm 波長紅外光誘導之基因 *VrGIR1* (*gibberellic acid*[GA]-*and infrared*[IR]-*induced gene1*)，其在阿拉伯芥中的相似基因 *GASA4* (*gibberellic acid-stimulated transcripts in Arabidopsis 4*) 同樣會受吉貝素及紅外光所誘導，因此本研究致力於了解 *GASA4* 在荷爾蒙及紅外光訊息傳遞當中所扮演的角色。吉貝素與茉莉酸分別調控植物的生長發育及防禦，但兩種荷爾蒙之間的交互作用目前還不是很明瞭。*GASA4* 目前已知參與在吉貝素的訊息傳遞路徑中，而 *FAR-RED INSENSITIVE 219* (*FIN219*)/*JAR1* 在先前的研究發現會參與在遠紅光及茉莉酸訊息傳遞中。本實驗室先前的研究發現 *GASA4* 基因會受 *FIN219* 的負調控，因此我們對於兩者在茉莉酸與吉貝素訊息傳遞中所扮演的角色，以及彼此之間的調控關係產生高度興趣。在本次研究當中，我們發現 *gasa4* 及 *fin219* 突變株都呈現對茉莉酸處理較不敏感的外表型，而對吉貝素處理則較野生型敏感。基因表現的研究則發現 *FIN219* 能正調控茉莉酸反應的相關基因表現，如 *MYC2*、*VSP1* 及 *JAZ1*，而 *GASA4* 則是扮演負調控者的角色。此外我們也發現 *GASA4* 能負調控 *SPINDLY* (*SPY*) 基因表現，而 *SPY* 在先前的研究已知能影響 *DELLA* 的蛋白質活性。最後我們也發現 *GASA4* 能負調控吉貝素訊息傳遞中的負調控者 *DELLA RGA-LIKE3* (*RGL3*) 的表現，而 *FIN219* 則正調控 *RGL3* 的表現，*RGL3* 已知也會參與茉莉酸訊息傳遞。綜合以上研究結果，我們推測 *FIN219* 與 *GASA4* 能藉由調控 *RGL3* 表現而共同影響植物中茉莉酸及吉貝素訊息傳遞的進行。除了對荷爾蒙的調控外，本研究也發現 *GASA4* 會與 *PSAK* 及 *NPQ4* 共同參與在紅外光抑制下胚軸的訊息傳遞路徑中，*GASA4* 扮演正調控者的角色，而 *PSAK* 及 *NPQ4* 則為負調控者。已知二氧化碳能吸收 4.3 μm 紅外光，推測紅外光能藉由促進植物的固碳作用進而影響光合作用效率，本研究發現紅外光照射能增加 C4 植物 *PEP carboxylase* 基因的表現，並且能延緩玉米與阿拉伯芥葉圓體的老化。綜

合以上實驗數據，我們認為 GASA4 能作為連結光與多種荷爾蒙訊息傳遞的重要因子，並且未來能應用於提高作物產量。

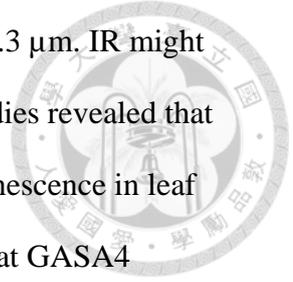


ABSTRACT



In previous study, *gibberellic acid*[GA]-and IR-induced *gene1* (*VrGIR1*) was isolated by differential display from mungbean (*Vigna radiate*) seedlings irradiated with 3~5 μm IR light. Its homolog in Arabidopsis, *GASA4* (*gibberellic acid-stimulated transcripts in Arabidopsis*) was also induced by GA and IR. My thesis aims to investigate the functions of *GASA4* in the crosstalk between GA and IR signaling pathways. Jasmonates (JA) and GA are important plant hormones that mainly mediate defense and growth, respectively. However, direct crosstalk between these two hormone pathways remains largely unknown. *GASA4* has been shown to participate in GA signaling, and FAR-RED INSENSITIVE 219 (*FIN219*)/*JAR1* was previously shown to play vital roles in far-red (FR) light and JA signaling pathway. Previous study indicated that *GASA4* was down-regulated by *FIN219*. It is interesting to understand the relationship between *FIN219* and *GASA4* in the integration of both GA and JA signaling. Here, we analyze the regulation between *FIN219* and *GASA4* in both GA and JA treatments. The results revealed that *gasa4* and *fin219* mutant showed an insensitive phenotype to JA treatment, but more sensitive to GA treatment. The gene expression studies indicated that *FIN219* positively regulated JA responsive genes, but *GASA4* negatively regulated them. *GASA4* was also found to regulate a GA responsive gene, *SPINDLY* (*SPY*), which can alter DELLA protein activity. Moreover, *GASA4* negatively regulated *DELLA RGA-LIKE3* (*RGL3*) expression, one of negative regulator of GA signaling that has been shown to participate in JA signaling, whereas *FIN219* positively regulates *RGL3* expression. Taken together, our data indicate that *FIN219* and *GASA4* participate in GA and JA signaling via regulating *RGL3* expression. In addition to the regulation of GA and JA signaling, *GASA4* was also involved in IR signaling pathway. The IR-induced *PSAK* and *NPQ4* genes were acting in this pathway

and regulated by GASA4. CO₂ can absorb IR wavelength at about 4.3 μm. IR might affect photosynthetic efficiency by improving CO₂ fixation. Our studies revealed that IR promotes the expression of *PEP carboxylase* gene and delays senescence in leaf discs of maize and *Arabidopsis*. Taken together, our data indicate that GASA4 functions as a crosstalk between light, including IR, and multiple hormones such as GA and JA, and may serve as a good candidate for future applications in improving crop yields.





縮寫對照表

ABRC	Arabidopsis Biological Resource Center
AOS	ALLENE OXIDE SYNTHASE
cDNA	Complementary DNA
cFR	Continuous far-red light
DNA	Deoxyribonucleic acid
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DMF	Dimethylformamide
dNTP	Deoxyribonucleoside triphosphate
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
EtBr	Ethidium bromide
FIN219	FAR-RED INSENSITIVE 219
GA	Gibberellin
GAI	GIBBERELIC ACID INSENSITIVE
GASA4	GIBBERELIC ACID-STIMULATED TRNSCRIPTS IN ARABIDOPSIS 4
GIR1	GIBBERELIC ACID-AND INFRARED-INDUCED GENE 1
GM	Germination medium
JA	Jasmonic acid
JAR1	JASMONIC INSENSITIVE 1
JAZ1	JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 1
LOX2	LIPOXYGENASE 2
MeJA	Methyl jasmonic acid
NPQ4	NONPHOTOCHEMICAL QUENCHING 4

OPR3	OPDA-REDUCTASE 3
PAC	Paclobutrazol
PCR	Polymerase chain reaction
PEPC1	PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYLASE 1
PHYA	PHYTOCHROME A
PHYE	PHYTOCHROME E
PSAK	PHOTOSYSTEM I SUBUNIT K
RGA	REPRESSOR OF GA
RGL1	RGA-LIKE 1
RGL2	RGA-LIKE 2
RGL3	RGA-LIKE 3
RT-PCR	Reverse transcription PCR
SPY	SPINDLY
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
UBQ10	Ubiquitin 10
VSP1	VEGETATIVE STORAGE PROTEIN 1



前言



一、緒論

光線與荷爾蒙是調控植物生長發育的重要因子。光能調控許多植物生長階段，包括種子萌發、光型態發生(photomorphogenesis)、避蔭作用(shade avoidance)、光合作用、植物趨光性、日照週期(circadian rhythms)和開花週期等(Sullivan and Deng, 2003)。在阿拉伯芥幼苗階段，光的照射與否會使植物具有顯著不同的外表型。在白光下生長的幼苗會呈現短下胚軸、子葉張開及葉綠素累積的外表型，稱為光型態發生；而在黑暗中的幼苗則呈現長下胚軸、子葉閉合及白化的外表型，稱為暗形態發生(skotomorphogenesis)。植物是透過光接受體(photoreceptor)來接收光訊息，這些光接受體包含主要吸收紅光及遠紅光波長範圍(600~750 nm)的光敏素(phytochromes)、主要吸收藍光波長範圍(400~500 nm)與 UV-A(320~400 nm)的隱花色素(cryptochromes)與向光素(phototropins)以及負責接收 UV-B 的光接受體。以上研究皆為可見光及短波長的非可見光，而自然界中還有屬於長波長的非可見光，稱為紅外光(Infrared light, IR)，其所涵蓋的範圍又可細分為近紅外光(0.75~1.5 μm)、中紅外光(1.5~10 μm)及遠紅外光(10~1000 μm) (Chaerle and Van Der Straeten, 2000)。目前對紅外光的應用主要是使用在工業及醫療用途，至於紅外光是否能影響植物生長發育過程尚未明瞭。

荷爾蒙同樣也在植物的生長發育中扮演了重要的角色，而不同荷爾蒙之間彼此相互作用共同微調植物在不同階段的生長發育過程。在植物的生長過程中，生長與防禦反應之間的拮抗作用呈現一種動態平衡，使植物能根據本身所處的環境將有限的資源作適當的分配。當植物遭受到草食性動物、病原菌或其他非生物逆境侵擾時，植物就必須減少供應生長發育的資源，而將其移作防禦反應之用，因此當植物遭受逆境時，通常會伴隨著生長發育的遲緩(Yang et al., 2012)。為了調節生長與防禦反應之間的平衡，植物便演化出許多調控機制以使其能快速根據所處環境作因應，其中植物荷爾蒙便扮演了重要的角色，主司生長的荷爾蒙與主司

防禦的荷爾蒙如何交互作用以共同調節植物生長發育及防禦反應，是目前熱門的研究重點。



二、植物的光訊息傳遞

2.1 光敏素

植物為了感受光線，演化出不同的光接受體以接收不同波長範圍的光源，在阿拉伯芥中目前已知遠紅光及紅光波長範圍(600-750nm)是由光敏素 A (phytochrome A, PHYA) 到光敏素 E (PHYE)所接收(Quail, 1997)。光敏素 (phytochrome)為可溶性色素蛋白，由色素分子(chromophore)以及蛋白質 (apoprotein)所組成。其具有兩個功能性的區域，其一位於 N 端能與色素分子結合以感應光線；其二則位於 C 端，目前被認為與訊息傳遞及形成二聚體有關。光敏素具有兩種不同的光譜形式，當構成不具活性的 Pr 形式時，會藉由紅光轉換成具生理活性的 Pfr 形式，而在吸收遠紅光後又會變回 Pr 形式 (Smith, 2000)。其中 PHYA 的 Pfr 形式為光分解型，而 PHYB 到 PHYE 的 Pfr 形式則能穩定存在於光中(Quail, 1997)。這兩種形式之間的轉換對於光敏素感應光線及其生理功能相當重要。

2.2 光訊息傳遞下游因子

植物的光訊息傳遞十分複雜，除了上游的光接收體外，目前也發現許多下游的訊息傳遞因子能幫助光訊息的傳遞。例如作用在 PHYA 訊息傳遞路徑之下的 *FHY1* (Desnos et al., 2001)、*FHY3* (Wang and Deng, 2002)、*FIN219* (Hsieh et al., 2000)、*SPA1* (Hoecker et al., 1998; Hoecker et al., 1999)、*HFR1* (Fairchild et al., 2000; Fankhauser and Chory, 2000; Kim et al., 2002)等。這些訊息傳遞因子最後都會將訊息匯集到一群名為 *COP/DET/FUS* 的多效性基因群，進而影響植物光型態發生。

三、吉貝素訊息傳遞

吉貝素(Gibberellins, GAs)是主要調控植物生長的荷爾蒙之一，參與在種子萌發、細胞延長與分生及花器形成的過程中 (Achard and Genschik, 2009)。植物體內 GA 的生合成可分為三個階段：首先在原質體(proplastid)中，Geranylgeranyl diphosphate (GGPP)經由 ent-copalyl diphosphate synthase (CPS)及 ent-kaurene synthase (KS)轉化為 ent-kaurene；接著進入內質網經由 ent-kaurene oxidase (KO)及 ent-kaurenoic acid oxidase (KAO)轉化為 GA₁₂；最後在細胞質經由 GA20 oxidase 及 GA 3 oxidase 之作用形成具生理活性的 GA₄ 或 GA₁，之後也可藉由 GA2 oxidase 轉換成不具活性的 GA (Sakamoto et al., 2004)。

DELLA 蛋白是 GA 相關基因表現的關鍵調控者，當植物感受到 GA 時，GA 會促進 GA 的接受器 GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 (GID1)以及 DELLA 之間的連結，進而造成 DELLA 蛋白降解。在阿拉伯芥中已發現五種 DELLA 蛋白，分別命名為, RGA, GAI, RGL1, RGL2 及 RGL3。這些 DELLA 蛋白可能共同或分別調控不同的生長發育過程。根據目前的研究，GAI 與 RGA 是 GA 反應的負調控者，能共同影響莖的延長、開花時間及根的生長等性狀 (Dill and Sun 2001; Fu and Harberd 2003)，然而 RGL2 主要參與受 GA 調控的種子萌發過程 (Lee et al. 2002)。RGA 及 RGL2 也被發現能共同抑制花器的發育 (Cheng et al. 2004; Hou et al. 2008; Yu et al. 2004)。RGL3 則是被研究出能正調控 JA 所造成的防禦反應 (Wild et al. 2012)。DELLAs 能藉由與特定的轉錄因子作結合以調控下游 GA 訊息傳遞相關基因的表現。例如 DELLA 能與 bHLH 轉錄因子 PIF3 作結合，因此使其無法促進下游參與下胚軸延長的基因表現(Feng et al. 2008)。

四、茉莉酸訊息傳遞

茉莉酸(jasmonic acid, JA)是主要調控植物防禦的荷爾蒙之一。茉莉酸為亞麻酸(linolenic acid)所衍生之帶有環戊酮(cyclopentanone)基團的化合物。在質體



(plastid)中亞麻酸會轉變為 OPDA，再送到過氧化體 (peroxisome)轉變為 JA，接著移至細胞質，藉由接上不同的氨基酸，行使不同功能 (Wasternack, 2007)。JA 為人所知的有氣態形式的 methyl-jasmonate (MeJA)；接上異亮氨酸(Isoleucine)則可成為活化態 jasmonoyl – isoleucine (JA-Ile) (Farmer and Ryan, 1990; Staswick, 2002; Fonseca et al., 2009)；除了植物體內自然合成的 JA 以外，還有一種由病原菌所製造的 coronatine，可以模擬活化態的 JA-Ile，因而啟動 JA 訊息傳遞，最後抑制植物體內的水楊酸(Salicylic acid, SA)訊息傳遞。此外，coronatine 也能促使植物氣孔張開，以利病原菌的入侵 (Block et al., 2005; Melotto et al., 2006)。當 JA 被轉化為活化態 jasmonoyl–isoleucine (JA–Ile)後，能促進 CORONATINE INSENSITIVE 1 (COI1)與 JA ZIM-DOMAIN (JAZ)蛋白的交互作用。COI1 屬於 E-box 蛋白，可與 SKP1、Cullin 所組成的 SCF^{COI1} 複合體，為 E3 ubiquitin ligase 的一種，能將目標蛋白泛素化而被送至 26S proteasome 降解(Devoto et al., 2002; Xu et al., 2002; Devoto and Turner, 2003; Katsir et al., 2008)。COI1 的目標蛋白質是一群名為 JAZs (JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN) 的蛋白質；JAZs 因具有 ZIM (Zinc-finger inflorescence meristem)而得名 (Nishii et al., 2000)。阿拉伯芥目前已知有 12 種 JAZs，分別命名為 JAZ1 到 JAZ12，除了皆具有 ZIM 之外，也含有 JAS 序列。實驗證明 COI1 會透過結合 JAS motif 而將 JAZs 送至 26s proteasome 降解 (Chini et al., 2007; Thines et al., 2007)。當 JAZs 被降解後，能與 JAZs 進行交互作用的轉錄因子便能被釋放而控制下游 JA 相關基因的表現。第一個被發現會與 JAZs 進行交互作用的蛋白為 MYC2，屬於 bHLH 轉錄因子，作用為 JA 反應的正調控者(Chini et al. 2007)。當有活性的 JA 生成時，會促進 JAZs 的降解而使 MYC2 被釋放而促進下游 JA 相關基因的表現 (Pauwels et al. 2009)。此外，MYC3 和 MYC4 也被發現能與 JAZs 結合共同調控 JA 反應。除了 bHLH 轉錄因子外，MYB 轉錄因子也會受到 JAZs 調控，而影響受 JA 所調控之花青素累積、毛狀體的生成及雄蕊的發育等性狀 (Qi et al. 2011; Song et al. 2011)。

五、吉貝素與茉莉酸訊息傳遞之間的交互作用

吉貝素與茉莉酸訊息傳遞間是否有交互作用，是目前研究的重點之一。

目前有許多的研究支持 GA 能調節 JA 所調控的防禦反應，首先 DELLA 蛋白能影響 JA 訊息傳遞基因的表現，並增加阿拉伯芥對 necrotrophs 病菌的抵抗能力，然而對水楊酸所調控對 biotrophs 的抵抗能力則是有抑制的作用，因此 DELLA 能調節植物 JA 與 SA 訊息傳遞的平衡以抵抗不同種類的病原菌侵擾(Navarro et al., 2008)。近期也有研究指出 DELLA 蛋白能藉由與 JAZ 蛋白的結合去影響 JAZ 抑制下游 JA 相關基因表現的作用(Hou et al. 2010)。此外，DELLA 蛋白 RGL3 的表現也被證實會受 JA 所誘導產生，而 RGL3 能正調控由 JA 所調節對於 necrotroph *Botrytis cinerea* 的抵抗能力，以及促進 hemibiotroph *Pseudomonas syringae* 的感染力。而 RGL3 能與 JAZ1 及 JAZ8 結合，因此 JA 所造成 RGL3 的累積也能藉由抑制 JAZ 的作用而促進 JA 反應(Wild et al., 2012)。

DELLA 與 JAZ 的交互作用同樣也會影響 DELLA 蛋白本身的作用，因此 JA 也能藉由促進 JAZ 蛋白的降解去影響 GA 所調控的生理性狀。DELLA 能藉由與 PIF 的結合使其無法促進下游影響細胞延長的基因表現，因此會有抑制下胚軸延長的外表型。JA 同樣也會抑制下胚軸的延長，但其抑制作用在 DELLA 四突變體(*gai-t6 rga-t2 rgl1-1 rgl2-1*)及 *pif4* 突變株中都有較不敏感的現象(Hou et al. 2010)，因此 JA 的抑制作用可能是藉由影響 JAZ 與 DELLA 的交互作用，進而影響 PIF 蛋白的活性所導致。之後的研究也證實 JAZ 除了會干擾 DELLA 與 PIF 的結合而影響受 PIF 調控的相關性狀外，還能藉由負調控 DELLA 蛋白表現而影響 GA 反應的進行 (Yang et al. 2012)。

六、GASA4

gibberellic acid -stimulate transcripts in Arabidopsis 4 (GASA4)，屬於 GASA 家



族的其中一員。此家族中最早被發現的是番茄中的 *GAST1* 基因，此基因會在缺乏內生 GA 的植株於外加 GA 後被誘導表現(Shi et al., 1992)。而後利用 *GAST1* 的序列作比對，找出阿拉伯芥中的 *GASA1* 到 *GASA4*，這些 GASA 基因的表現具有組織特異性，其中 *GASA1* 會在花芽及果莢中表現，*GASA2* 及 *GASA3* 則是表現在乾燥的果莢及種子中，而 *GASA4* 則是表現在延長中的根、花芽以及分生組織中。GA 對 GASA 家族的基因表現之影響也不同，*GASA1* 與 *GASA4* 的表現會受 GA 所誘導，但 *GASA2* 與 *GASA3* 之表現則不受 GA 影響(Aubert et al., 1998)。目前在阿拉伯芥中已經發現 15 個 GASA 家族成員(Zhang and Wang, 2008)。GASA 家族的蛋白序列都不具有目前已知的 motif 或 active site，但都具有共同特性：N 端有一段被推測作用為訊號傳遞的序列；C 端則是具有 12 個半胱胺酸(cysteine)的保守序列。後續有研究顯示 C 端的保守序列與植物氧化還原的功能有關。大量表現 *GASA4* 的轉殖株在創傷處理下過氧化氫的累積量會比野生型低，但若大量表現的是將 12 個半胱胺酸突變後的片段，則其代謝過氧化氫的能力便會消失(Rubinovich and Weiss, 2010)。

七、GASA 家族參與在不同荷爾蒙交互作用的路徑中

除了受到 GA 的調控外，有些 GASA 基因也被研究出會受其他荷爾蒙的調控或參與其他荷爾蒙的反應路徑中。部分 GASA 基因會參與 ABA 反應，其中 *GASA2/3* 及 *GASA14* 的表現會受 ABA 的誘導，而 *GASA4*、*GASA6*、*GASA7* 及 *GASA9* 則會受到 ABA 的抑制 (Zhang and Wang, 2008)。在水稻中發現的 *OsGSRI* 則被發現會參與 GA 及 BR 交互作用過程中(Wang et al., 2009)。大量表現 *FsGASA4* 不但能增加內生 SA 的量，還能增加 SA 生合成及訊息傳遞基因的表現。總體來說，GASA 基因會參與在不同荷爾蒙訊息傳遞交互作用中。近期有人提出 GASA 基因能藉由三種方法參與不同荷爾蒙的作用：(1) 調節氧化還原恆定(Redox homeostasis) (2) 調控 DELLA 基因的表現 (3) 直接影響該荷爾蒙的生合成

(Nahirňak et al., 2012)。



八、GASA4 先前的研究

本實驗室先前的研究，發現紅外光對植物的下胚軸延長有抑制的作用(Chen et al., 2007a)，之後利用差異表現法篩選在綠豆中會受到紅外光誘導表現的基因 *GIBBERELLIN- AND INFRARED LIGHT-STIMULATE TRANSCRIPT 1 IN VIGNA RADIATE* (*VrGIR1*)，而此基因在阿拉伯芥的同源基因為 *GASA4*，其基因表現同樣會受 GA 及 IR 處理所誘導。在遠紅光照射下，許多參與光訊息傳遞基因的突變株(如 *phyA*、*phyB*、*cry1*、*spa1* 及 *cop1-5* 等)中 *GASA4* 基因表現都有較野生型低的現象，顯示 *GASA4* 可能參與在遠紅光訊息傳遞過程中。此外 *GASA4* 基因表現在各種光源下都會受到遠紅光訊息傳遞因子 *FIN219* 的抑制。*gasa4* 突變體會對紅光及遠紅光抑制下胚軸延長的敏感度降低，而轉殖 *GASA4* 基因到 *gasa4* 突變株後可回復其對光的感應；這樣的外表型在相同條件下外加 GA 後更為顯著。*gasa4* 突變體中幾個參與 GA 代謝的基因，包括 *GA 20-oxidase 1*、*GA 3-oxidase 1*、*GA 2-oxidase 2* 表現量增加。綜合上述研究可知遠紅光訊息可透過 *FIN219* 抑制 *GASA4*，調控 GA 相關基因，以調節植物發育時期下胚軸的生長 (Chen et al., 2007a)。而 *gasa4* 突變株在 3~5 μm 紅外光照射下會具有較野生型長的下胚軸，代表 *GASA4* 基因突變後會對紅外光所造成對下胚軸的抑制較不敏感。此外 *GASA4* 也會負調控 *CHS* 基因的表現，使 *gasa4* 突變株在紅外光照射下具有花青素大量累積的外表型。而之後利用 microarray 篩選會受紅外光調控的基因，發現參與光合作用的基因 *PSAK /PSIK* (PHOTOSYSTEM I SUBUNIT K)及 *PSBS/NPQ4* (NONPHOTOCHEMICAL QUENCHING 4)在紅外光照射下會有顯著上升的表現，而在 *gasa4* 突變株中 *NPQ4* 的表現又比野生型低，可見 *GASA4* 會正調控 *NPQ4* 的表現。在 3~5 μm 波段中挑選出特定波長進行實驗，發現在 5 μm 紅外光中 *GASA4* 的表現量有明顯提升的現象，而在 4.5 μm 則表現量下降，顯示

不同波長的紅外光會造成會對植物生長造成不同的影響。已知二氧化碳能吸收 4.3 μm 紅外光，推測照射紅外光能增加植物的固碳作用，因此觀察在紅外光照射下負責固碳作用的 PEP carboxylase 的酵素活性，發現紅外光會使其酵素活性提升 30~50%，尤其在 4.3、5.0 及 5.9 μm 的紅外光照射下具有最顯著的提升，表示紅外光照射可能對 C4 及 CAM 植物中的二氧化碳固定有幫助，進而提升光合作用效率。

九、 FIN219

fin219 (*far-red insensitive 219*) 突變株是經由篩選 *cop1-6* (*constitutive photomorphogenic 1*) 突變株的 suppressor line 而來。*cop1-6* 在黑暗中會呈現光形態發生的短下軸及子葉打開的外表型，而將經過 EMS 處理後的 *cop1-6* 種子同樣生長於黑暗環境中，並篩選出在突變後具有長下胚軸及子葉閉合外表型的植株，再經過與野生型的側交(outcross)後，即獲得 *fin219* 突變株，並經由 mapping 得知突變點在 FIN219 基因上。進一步的觀察不同光源下的 phenotype 後發現 *fin219* 突變株只有在遠紅光下會呈現長下胚軸的外表型，在其他光照或黑暗下都與野生型相似。由於 *fin219* 突變株在遠紅光下的外表型類似於 *phyA* 及其他參與 *phyA* 訊息傳遞基因的突變株，因此 FIN219 可能參與 PHYA 調控遠紅光訊息傳遞的路徑中。大量表現 FIN219 基因的轉植株則對遠紅光有過敏感(hypersensitive)的外表型。FIN219 基因屬於 GH3 基因家族成員之一，可受生長素(auxin)快速的誘導表現(Hsieh et al., 2000)。生物資訊分析 FIN219 的氨基酸序列則發現，其在 N 端及 C 端各有一個 coiled-coil domains，則可能是 FIN219 能與其他蛋白質產生交互作用的區域。

為了更加了解 FIN219 之生理作用，先前利用酵母菌雙雜合(Yeast two-hybrid) 篩選會與 FIN219 結合的蛋白質，找到 FIP1 (Chen et al., 2007b)。FIP1 屬於 GST tau

class 的成員之一，進一步利用 pull down 及 co-IP 的方式，證實其與 FIN219 之間確實會有交互作用。*fip1* 的大量表現及降低表現的突變株都對遠紅光呈現不敏感的長下胚軸外表型，我們推測 FIN219 與 FIP1 能藉由彼此的交互作用共同調控遠紅光訊息傳遞。除此之外，利用酵母菌雙雜合法及 pull down 的方法證實 FIN219 與 COP1 之間也會有交互作用的產生，而經由雙分子螢光互補法(BiFC)發現兩者會在細胞質進行交互作用，因此推測在遠紅光下 COP1 會因為與 FIN219 結合而無法進核調控 HY5，最後促進光形態發生(Wang et al., 2011)。

近期對於 JA 訊息傳遞的研究則發現參與 JA 訊息傳遞的 JASMONATE RESISTANT 1 (JAR1)基因與 FIN219 位於同一基因座(locus)上，JAR1 為將 JA 接上 Ile 形成活化態 JA-Ile 的關鍵酵素(Staswick, 2002)。

十、PSAK 與 NPQ4

光合作用是植物將吸收之光能轉換為化學能的過程。高等植物光合作用的反應中心有兩個：吸收光波長 680nm 的光系統 II (photosystem II)與吸收光波長 700nm 的光系統 I (photosystem I) (Chitnis, 2001)。光系統 I 的結構主要是在核心有結合葉綠素 a(chlorophyll a) 的複合體，以及周圍會與葉綠素 b (chlorophyll b) 結合的光接收天線(light-harvesting complex , LHCI)組合成的反應中心(Jensen et al., 2000)。光系統 I 的核心是由兩個 subunit : PSI-A、PSI-B 組成之 heterodimer，用於接收由光系統 II 電子傳遞鏈的訊號，其他周圍的 subunit 並不會與接收電子的色素分子結合。但最近的研究顯示，還有其他構成光系統 I 反應中心的其他 subunit 會與一些色素分子結合，這些其他成員在高等植物及綠藻中都有被發現，包括有 PSI-L、PSI-I、PSI-K、PSI-J、PSI-F 及 PSI-M。有研究顯示在缺乏 PSIK/PSAK 的阿拉伯芥中，會造成周圍部分 light harvesting complex a (Lhca)的分離導致降低光合作用的效率(Jensen et al., 2000)。

為了確保光合作用在很低的光照度下依然維持一定的效率(Dekker and

Boekema, 2005), 光系統反應中心 II 對於植物生長發育雖不可或缺, 但太多的光通量也會對植物造成負擔, 因此植物發展了一套有效率調控能量通過光系統的機制, 稱為非光化學能消散(non-photochemical quenching, NPQ) (Horton et al., 1996; Szabo et al., 2005), 其作用為將過多的光能轉換為熱能而消散, 避免過剩的能量使光系統受到傷害。NPQ4/PSBS 蛋白能影響光系統 II 的穩定性 (Kiss et al., 2008)。此外在阿拉伯芥中也發現當缺乏 *NPQ4* 表現時會影響植物生長、種子的產量與質量及光合作用的效率(Krah and Logan, 2010)。

十一、PEP carboxylase

PEP carboxylase 不僅廣泛存在於光合生物, 如植物、藍綠藻和光合細菌中, 還存在於許多非光合細菌及原生動物中。植物 PEP carboxylase 具有許多生理功能, 在 C4 及 CAM 植物中為催化 PEP 和 HCO_3^- 生成 OAA 的重要酵素, 能促進二氧化碳的固定而增加植物的光合效率。在 C3 植物中則會參與種子之形成與萌發、果實的成熟、保衛細胞中的碳代謝及根瘤共生菌的氮固定等(Chollet et al., 1996)。

十二、研究目標

本論文主要分成兩個部分：由於之前的研究發現, *FIN219* 在不同光源下都會負調控 *GASA4* 基因的表現, 而 *GASA4* 及 *FIN219* 又分別參與 GA 及 JA 訊息傳遞路徑中, 因此兩者的調控關係是否能共同影響 GA 與 JA 訊息傳遞是本研究之研究目標。針對這個部分, 我們首先會針對吉貝素及茉莉酸的相關性狀作觀察, 檢查 *gasa4*、*fin219-2* 及 *gasa4fin219-2* 突變株是否具有對吉貝素或茉莉酸異常反應的外表型。接著利用 RT-PCR 分析各突變株在吉貝素及茉莉酸處理下相關基因表現量的差異。此外, 我們也發現 *GASA4* 會參與在紅外光訊息傳遞機制中, 本研究也希望釐清 *GASA4* 與光合作用相關蛋白 PSAK 及 NPQ4 是否皆參與紅外光訊息傳遞, 而其所扮演的角色又為何? 在這個部分我們首先會先建構大量表現及

降低表現 *PSAK* 及 *NPQ4* 在野生型及 *gasa4* 突變株背景的轉殖株，再利用這些轉殖株經紅外光照射後其幼苗下胚軸長度作為指標，推測這兩個基因在紅外光訊息傳遞中是做為正向或負向調控者，以及兩者與 *GASA4* 之間的調控關係。



材料與方法



一、植物材料與生長條件

gasa4 (SALK_042431)及 *fin219-2* (SALK_059774)突變株是從 Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC)所取得的 T3 或 T4 世代種子, 為 Col-0 生態型。
pGASA4GFP 為以 GASA4 本身的啟動子大量表現 GASA4 基因在 *gasa4* 背景的轉殖株。
pGR219 為以糖皮質激素(glucocorticoid)引誘大量表現 FIN219 基因在 *fin219-2* 背景的轉殖株。雜交取得材料為 *gasa4fin219-2*、*gasa4pGR219*、*fin219-2pGASA4GFP* 及 *pGR219pGASA4GFP*, 皆為 Col-0 背景。

以 20% 漂白水(含 0.5% Tween-20)浸泡震盪 7 分鐘後, 以無菌水清洗 5 次, 將種子播撒在 1% GM 培養基上, 經過黑暗春化三天後移至白光生長箱中使之生長, 待長至真葉長出的階段再將幼苗移到有機培養土中, 於長日照(光週期 16 小時光照, 8 小時黑暗)生長室中生長。

玉米種子是從農友種苗公司所購得的華珍二號(HV-124)。將玉米種子經過流水沖泡隔夜後, 播撒在有機培養土上, 於全日照生長箱中生長。

二、質體之建構與基因轉殖

pCaMV35S::PSAK // pCaMV35S::PSAKAS

利用 5'-CAAGGATCCATGGCTAGCACTATG-3' 及 5'-CCAGGATCCTCAAA TAGCACCAAT-3' 將 *PSAK* 基因的 CDS 以 KAPA HiFi™ DNA polymerase 擴增後, 轉入 yT&A vector (RBC), 再以 BamHI 切下後接到 pCambia1380-BAR。

pCaMV35S::NPQ4 // pCaMV35S::NPQ4AS

利用 5'-GGATCCATGGCTCAAACCATGCTGC-3' 及 5'-GGATCCTTAGCTT TCTTCACCATCAT-3' 將 *NPQ4* 基因的 CDS 以 KAPA HiFi™ DNA polymerase 擴增後, 轉入 yT&A vector (RBC), 再以 BamHI 切下後接到 pCambia1380-BAR。

將構築好的質體以電穿孔(electroporation)方法轉入農桿菌(GV3101)中，利用花序浸泡轉殖法(floral dipping) (Clough and Bent, 1998) 轉入阿拉伯芥(野生型 Col 及 *gasa4* 突變株)中，利用轉殖質體上帶有的篩選標誌，在含有抗生素的培養基上進行篩選。於 T₁ 世代將具抗性的植株移至有機培養土中生長，並分別收集其下一代種子(T₂)。T₂ 世代挑選抗性與不抗之比例為 3:1 的品系，代表轉殖進入之 T-DNA 為單一插入，收集下一代種子(T₃)。T₃ 世代挑選具有全抗的品系，代表其為同型合子(homozygotes)轉植株，再收取 T₄ 世代用作後續實驗分析材料。

三、Genomic DNA 萃取

剪下成株阿拉伯芥的葉片，利用液態氮冷凍後，用研磨棒磨碎並加入 200 μ l 萃取液(0.2 mM Tris-HCl, pH9.0; 0.4 M LiCl; 25 mM EDTA; 1% SDS)，混勻後放冰上。以 13000 rpm, 4°C 下離心 10 分鐘，取出 180 μ l 上清液並加入等體積 isopropanol，搖晃均勻後放 -20°C 沉澱 30 分鐘。以 13000 rpm, 4°C 下離心 10 分鐘，盡可能倒掉上清液後，用真空乾燥機使 gDNA 沉澱乾燥，加入 20 μ l DEPC-H₂O 回溶。

四、下胚軸測量

將消毒後之種子各 30 顆分別播撒在 0.3% GM 培養基，以及含有 50 μ M GA, 50 μ M MeJA 及同時添加兩種荷爾蒙的 0.3% GM 培養基，經過黑暗春化三天後，移至白光下照射 12~16 小時，再移至不同光強度的遠紅光或黑暗環境下處理三天，以 ImageJ 軟體測量下胚軸長。

五、根長測量

將消毒後之種子播撒在含有 0.3% GM 培養基上，置於 4°C 黑暗春化三天後，移至白光生長箱生長七天，再將七天大的幼苗移至含不同濃度 MeJA 的 0.3% GM

培養基上，垂直培養五天後拍照記錄，並以 ImageJ 軟體測量根長。



六、GA 促進百分比及 MeJA 抑制百分比公式

$$\text{促進百分比} = \frac{(\text{外加GA}_3\text{處理的下胚軸}-\text{正常生長的下胚軸})}{\text{正常生長的下胚軸/根長長度}} \times 100 (\%)$$

$$\text{抑制百分比} = \frac{(\text{正常生長的下胚軸/根長長度}-\text{外加MeJA處理的下胚軸/根長長度})}{\text{正常生長的下胚軸/根長長度}} \times 100 (\%)$$

舉例來說，正常生長的下胚軸長度為 10 mm，外加 GA 的下胚軸長度為 15mm，外加 50 μM MeJA 的下胚軸長度為 5 mm。則這次實驗的 GA 促進百分比為： $[(15-10)/10]*100=50\%$ ，即促進了本來長度的百分之五十；MeJA 抑制百分比為： $[(10-5)/10]*100=50\%$ ，即抑制了本來長度的百分之五十。GA 促進百分比越高，代表此植株對 GA 越敏感；MeJA 抑制百分比越高，代表此植株對於 MeJA 越敏感。

七、花青素之萃取及定量

將 200 顆消毒後之種子播撒在 0.3% GM、50 μM MeJA、50 μM GA 或同時加入 50 μM MeJA 及 50 μM GA 的 0.3% GM 培養基上，先在 4 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗春化三天後，移至白光 16 小時，最後再移至不同光強度的遠紅光或黑暗中處理三天。將收取到的植物材料稱重後，以液態氮冷凍並以研磨棒磨碎。加入 600 μl 萃取液 (1% HCl in methanol)，置於 4 $^{\circ}\text{C}$ 搖晃過夜。第二天加入無菌水與 chloroform 各 400 μl ，以 13000rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下離心十五分鐘，取上清液 200 μl 至 96 孔盤後，測量 530nm 及 657nm 的吸光值，帶入公式 $A_{530}-0.33A_{657}$ ，最後將所得到的值除以鮮重 (fresh weight)，即得到花青素含量 (Kim et al., 2003)。

八、葉綠素之萃取及定量

將收取到的植物材料稱重後，以液態氮冷凍並以研磨棒磨碎。加入 100 μl

dimethylformamide (DMF) ，置於 4°C 搖晃過夜。第二天以 13000 rpm, 4°C 下離心十分鐘後，取 50 μ l 上清液再加入 450 μ l 100% 酒精稀釋，搖晃均勻後取 200 μ l 至 96 孔盤，測量 750 nm、664 nm 及 647 nm 的吸光值，帶入公式 $19.43(A_{647}-A_{750})+8.05(A_{664}-A_{750})$ ，最後所得的值除以鮮重即得到葉綠素含量 (Porra et al., 1989)。

九、種子發芽測試

將消毒後之種子各 100 顆播撒在含不同濃度 PAC 的 0.3% GM 培養基上，置於 4°C 黑暗春化三天後，移至白光生長箱，逐日觀察種子發芽比率(以長出新芽 1mm 判定為發芽)。

十、RNA 萃取與 RNA 表現量分析

將各種處理下之植株材料抽取其 total RNA(詳細實驗過程見附錄一)，再利用 RT-PCR 的方式比較不同基因表現量，並以 Ubiquitin10 當作 loading control (所使用之引子見附錄二列表)。

十一、蛋白質萃取及表現量分析

以西方墨點法(Western blot)偵測蛋白質表現。收取各種處理條件下的植物材料，以液態氮冷凍並用研鉢磨成粉末。加入 100 μ l 蛋白質萃取液(50 mM Tris-Cl, pH7.5；150 mM NaCl；10 mM MgCl₂；0.1% NP-40；1 mM PMSF；1X protease inhibitor cocktail) 作萃取，離心後取得之上清液即為總蛋白質。利用 Bradford 法作定量。取 200 μ g 蛋白質跑 SDS-PAGE 作分析。以 400 mA 電流將蛋白質轉印至 PVDF 膜上，進行抗體辨識(GASA4 用 2500x GFP 抗體偵測；FIN219 用 2500x FIN219 單株抗體偵測)。使用 T-pro LumiFast Plus ECL Kit，進行 ECL (Enhanced Chemi-Luminescence) 呈色反應，以 LAS-3000 (FUJIFILM) 偵測冷光訊號。

Chapter I



Functional Studies of the Regulatory Relationship between *GASA4* and *FIN219* in the Integration of Gibberellin and Jasmonate Signaling in *Arabidopsis*

阿拉伯芥 *GASA4* 與 *FIN219* 之間的調控關係在吉貝素與茉莉
酸訊息傳遞交互作用中的功能性研究



結果

一、GASA4 及 FIN219 會影響 JA 及 GA 調控之外表型

1-1、荷爾蒙 GA 及 JA 對 *gasa4* 及 *fin219* 突變體下胚軸的影響

已知 GA 會促進下胚軸生長而 JA 則會抑制下胚軸生長，為了測試 GASA4 與 FIN219 是否共同參與在吉貝素及茉莉酸的訊息傳遞路徑中，我們觀察各突變株在 GA₃ 或 MeJA 處理下的下胚軸長度，進行初步的分析。首先我們先觀察在遠紅光下處理不同濃度的 GA₃ 及 MeJA 對野生型 Col、各別突變株 *gasa4*、*fin219-2* 以及雙突變株 *gasa4fin219-2* 下胚軸長度的影響。結果顯示 GA₃ 濃度越高，促進下胚軸延長的程度也越高，而在 10、25、50 μM GA₃ 處理下 *fin219-2* 突變株及雙突變株 *gasa4fin219-2* 都對 GA 呈現較敏感的外表型(圖一 A~B)；*gasa4* 突變株則是在 1、10、50 μM GA₃ 處理下會呈現較敏感的外表型，其中 50 μM GA₃ 處理下的差異性最明顯(圖一 A~B)。因此之後會固定使用 50 μM GA₃ 作處理濃度。另一方面，MeJA 濃度越高，抑制下胚軸延長的程度也越明顯，而在不同濃度 MeJA 處理下 *fin219-2* 突變株及雙突變株 *gasa4fin219-2* 都對 JA 呈現較不敏感的外表型(圖一 C~D)；而 *gasa4* 突變株則是在 25、50、75 μM MeJA 處理下與野生型皆會呈現較敏感的外表型(圖一 C~D)。其中在 50 μM MeJA 處理下 *gasa4* 突變體較野生型有稍微對 MeJA 較不敏感的現象，因此之後會固定使用 50 μM MeJA 作處理濃度。

接著我們將野生型 Col、兩者的突變株 *gasa4*、*fin219-2* 以及雙突變株 *gasa4fin219-2* 播撒在不添加、只含 50 μM GA₃、只含 50 μM MeJA 以及兩者均添加的 0.3% GM 培養基上，在黑暗及不同光強度之遠紅光下生長三天後，測量植株下胚軸長度。結果顯示，在黑暗或遠紅光照射下，50 μM GA 都能促進下胚軸的延長(圖二；圖三)，而 *gasa4*、*fin219-2* 及雙突變體 *gasa4fin219-2* 只有在遠紅光照射下會較 Col 具有較延長的胚軸(圖二 B~C；圖三 C~F)，顯示在遠紅光

下各突變株都對 GA 的促進作用較敏感，因此 GASA4 及 FIN219 均可能參與在吉貝素的訊息傳遞路徑中，並且都是扮演負調控者的角色。另一方面，我們也發現添加 50 μ M MeJA 在各種情形下也都能抑制下胚軸的生長(圖二；圖三)；而 *gasa4*、*fin219-2* 及 *gasa4fin219-2* 無論在黑暗及遠紅光照射下都具有較長的下胚軸(圖二；圖三)，顯示各突變株都對 JA 的抑制作用較不敏感，因此 GASA4 及 FIN219 均可能參與在茉莉酸的訊息傳遞路徑中，並且可能都是扮演正調控者的角色。

1-2、GASA4 與 FIN219 參與茉莉酸在弱遠紅光下促進花青素累積

花青素的累積也是 JA 反應的重要指標之一，當植物受到逆境時會大量合成 JA，以誘導花青素的累積來抵抗外來傷害，因此我們也同樣觀察在黑暗及不同光強度遠紅光照射下，GA 及 MeJA 處理對花青素累積造成的影響。由圖四的結果可知，無論在黑暗及遠紅光照射下，MeJA 處理都會造成花青素的累積；而只有在強遠紅光照射時 GA 處理才會抑制花青素累積。而 *gasa4*、*fin219-2* 及 *gasa4fin219-2* 在黑暗及弱遠紅光照射下，在處理 MeJA 下都較野生型具有較少的花青素累積，顯示其對於 MeJA 所造成花青素累積的作用較不敏感，因此 GASA4 與 FIN219 皆在弱遠紅光下由茉莉酸引發花青素累積的訊息傳遞途徑中扮演正調控者角色。

1-3、*fin219-2* 突變株在各種不同的 MeJA 濃度下均具有對 JA 不敏感的根長外表型

除了影響下胚軸長度外，JA 也會抑制植物根的生長，因此我們也檢測野生型及各突變株在 JA 處理下根的長度。我們利用了三種不同濃度的 MeJA (1、5、10 μ M) 以進行根長抑制性的觀察。隨著處理的 MeJA 濃度越高，對根的抑制性越明顯(圖五 A)。將抑制程度轉換為抑制百分比後，可以發現 *fin219-2* 及

gasa4fin219-2 在各種濃度下都有較野生型 Col-0 具有較低的抑制百分比(圖五 B)；而 *gasa4* 只有在 1 μ M MeJA 具有較長的主根(圖五 B、C)。因此我們得到與下胚軸測量相同的結果，即 GASA4 與 FIN219 可能都參與在茉莉酸訊息傳遞路徑中，並且都扮演正調控者的角色。

1-4 GASA4 與 FIN219 參與吉貝素促進種子萌發

由於已知 GA 會促進種子的萌發，因此我們想了解 GASA4 及 FIN219 是否也會參與在 GA 促進種子萌發的調控過程中，因此我們也利用之前所提到的突變株種子進行發芽率的測試。在此所使用的藥劑 Paclobutrazol (PAC)，為 GA 生合成抑制劑，能抑制 ent-kaurene 進行氧化作用形成 GA₁₂ 的反應，進而抑制內生性 GA 的生合成。我們將種子播撒在含不同濃度 (25、50、100、250 μ M) PAC 的 GM 培養基上，先經黑暗冷處理三天後，移至白光下生長並逐日觀察種子的發芽比例。隨著 PAC 濃度提升，種子發芽的比例會越低。*fin219-2* 及 *gasa4fin219-2* 在不同濃度 PAC 處理下發芽率都較野生型高(圖六 A)；而 *gasa4* 則是只有在 50 μ M PAC 處理下具有較野生型高的發芽率(圖六 A)。圖六(B)則是在 250 μ M PAC 處理下，逐日所觀察到的發芽率之統計圖，我們同樣可以發現 *fin219-2* 及 *gasa4fin219-2* 的發芽率明顯高於野生型，而 *gasa4* 反而有略低於野生型的現象。

當 PAC 處理的時間延長到兩周後，發現長出的植株有白化的現象，測量其葉綠素含量後發現，在 25 μ M PAC 處理下，*fin219-2* 及 *gasa4fin219-2* 的葉綠素含量明顯高於野生型，而 *gasa4* 突變株的含量則略低於野生型(圖七 A~B)。

二、GASA4 與 FIN219 會彼此調控對方的表現

根據外表型的觀察結果，我們推測 GASA4 及 FIN219 都會參與在 GA 及 JA 訊息傳遞路徑中，而實驗室先前的研究也發現 FIN219 在各種光源處理下都會抑制 GASA4 的表現 (Chen et al., 2007a)，進一步想要探討在不同荷爾蒙處理下兩者

的調控關係。我們將各植株分別種植在不添加、只含 50 μ M GA₃、只含 50 μ M MeJA 以及兩者均添加的 0.3% GM 培養基，在黑暗及遠紅光下生長三天後，抽取其 RNA 作基因表現檢測。結果顯示在遠紅光照射下處理 GA 或 MeJA, *fin219-2* 突變株中 *GASA4* 的表現量都高於野生型 Col(圖八 A~B)，可見 FIN219 會負調控 *GASA4* 的表現；而無論是在黑暗或遠紅光照射下處理 GA 或 MeJA, *gasa4* 突變株中 *FIN219* 的表現量都高於野生型 Col(圖八 A~B)，可見 *GASA4* 同樣也會負調控 *FIN219* 的表現。由於基因層次所顯現出的差異並不明顯，我們也測量在相同處理條件下 *GASA4* 及 *FIN219* 的蛋白質表現。我們利用 *pGASA4GFP*、*fin219-2pGASA4GFP* 及 *pGR219pGASA4GFP* 為材料，並以 GFP 抗體偵測，觀察 *FIN219* 的表現是否影響 *GASA4* 的蛋白質表現。*GASA4* 的表現會受 GA 處理所抑制，而在 MeJA 處理下 *FIN219* 也會負調控 *GASA4* 的表現(圖八 C)；另一方面，我們也利用 Col、*gasa4* 及 *pGASA4GFP* 為材料，並以 *FIN219* 抗體偵測，觀察 *GASA4* 是否影響 *FIN219* 的蛋白質表現。*FIN219* 的表現會受 GA 及 MeJA 所促進，而在 GA 處理下 *GASA4* 也會負調控 *FIN219* 的表現(圖八 C)。

三、*GASA4* 及 *FIN219* 共同調控 JA 相關基因的表現

由於前述外表型檢測發現 *GASA4* 及 *FIN219* 都會參與在 JA 訊息傳遞路徑中，因此接下來我們利用 RT-PCR 去檢測參與在 JA 生合成或訊息傳遞路徑中的重要基因，其表現量是否受到 *GASA4* 或 *FIN219* 的調控。

3-1、JA 生合成基因

ALLENE OXIDE SYNTHASE (AOS) 和 LIPOXYGENASE 2 (LOX2) 是茉莉酸的生合成酵素之一，在質體(plastid)中作用為將亞麻酸轉化成重要前驅物 OPDA。OPDA-REDUCTASE 3 (OPR3) 則是在過氧化氫體中將 OPDA 轉化為 JA 的重要酵素。在 MeJA 處理下，*fin219-2* 突變株中 *LOX2*、*OPR3* 及 *AOS* 的表現

量都低於 Col；而 *gasa4* 突變株則是具有較 Col 高的表現量(圖九)。在 GA₃ 處理下，*GASA4* 對這些基因的影響並不明顯，只有 *fin219-2* 突變株中 *LOX2* 表現量有略為下降的現象(圖九)。因此在 MeJA 處理時，*FIN219* 能正調控這些 JA 生合成基因的表現，而 *GASA4* 則是扮演負調控者的角色。

3-2、JA 訊息傳遞因子

MYC2 是 JA 反應的正調控者，JA 處理已知會誘導其基因表現。外加 GA₃ 並不影響 *MYC2* 的表現，而外加 MeJA 則是有促進的作用(圖十)。此外 *fin219-2* 突變株具有較 Col 低的表現量，而 *gasa4* 突變株則是具有較高的表現。

VEGETATIVE STORAGE PROTEIN 1 (VSP1) 是參與 JA 所誘導之防禦反應的重要基因，在植物受到逆境時會受 JA 誘導而大量表現。根據我們的實驗結果發現 GA₃ 處理也會些微誘導 *VSP1* 的表現，而 *FIN219* 在過程中似乎扮演了正調控的角色；外加 MeJA 確實會使 *VSP1* 大量表現，與 Col 相比，*fin219-2* 突變株具有較低的表現，而 *gasa4* 突變株則是具有較高的表現量。

JAZ1 是 JA 訊息傳遞的負調控者，但根據先前的研究已知 *JAZ1* 的表現也會受到 JA 的引誘，因此也可以當作觀察 JA 反應的重要基因。實驗結果發現 GA₃ 處理同樣會些微誘導 *JAZ1* 的表現，而 *FIN219* 在過程中似乎扮演了正調控的角色，而 *GASA4* 則是負調控的作用；外加 MeJA 也會使 *JAZ1* 表現量上升，與 Col 相比，*fin219-2* 突變株具有較低的表現，而 *gasa4* 突變株則是具有較高的表現量。

綜合以上結果，*FIN219* 能正調控這些 JA 訊息傳遞因子的表現，而 *GASA4* 則是扮演負調控者的角色。

四、*GASA4* 及 *FIN219* 共同調控 GA 相關基因表現

前述外表型檢測也發現 *GASA4* 及 *FIN219* 可能會參與在 GA 訊息傳遞路徑中，因此接下來我們同樣利用 RT-PCR 去檢測參與在 GA 訊息傳遞路徑中的重要基因

之表現，觀察這些基因是否受到 GASA4 或 FIN219 的調控。



4-1、DELLA 基因

DELLA 蛋白是 GA 反應的關鍵調控者，而在先前的研究也發現部分 GASA 會影響 DELLA 的表現，因此我們檢測在各種處理下，阿拉伯芥五種 DELLA (*RGA*、*GAI*、*RGL1*、*RGL2* 及 *RGL3*) 的基因表現。結果顯示在五個 DELLA 中只有 *RGL3* 的表現明顯受 *GASA4* 及 *FIN219* 的調控(圖十一)。在 GA_3 處理下，*RGL3* 的表現量會些微上升，而 *gasa4* 突變株的表現則是有略高於 Col 的現象；外加 MeJA 也會促使 *RGL3* 的表現量上升。與 Col 相比，*fin219-2* 突變株明顯具有較低的表現，而 *gasa4* 突變株則是具有較高的表現量。以上結果顯示在 MeJA 處理下，*FIN219* 能正調控 *RGL3* 的表現，而 *GASA4* 則是扮演負調控者的角色。

4-2、SPY 基因

SPINDLY (SPY) 是影響 DELLA 蛋白活性的重要基因，因此我們也同樣檢測 *SPY* 基因在不同處理下的表現量。結果顯示，MeJA 處理會使 *SPY* 基因表現略微下降，而 *gasa4* 突變株有明顯高於 Col 的表現量(圖十一)。因此在 MeJA 處理下，*GASA4* 似乎也能藉由抑制 *SPY* 的表現去影響 DELLA 蛋白的活性，進而調控 GA 反應。

討論



一、GASA4 與 FIN219 共同參與在吉貝素訊息傳遞路徑

經由對 GA 相關性狀的觀察，我們發現不同的植物組織中 GASA4 及 FIN219 的影響程度不同。在下胚軸的促進性測試中(圖二；圖三)，*gasa4* 及 *fin219-2* 都呈現對 GA₃ 處理較為敏感的長下胚軸外表型，而 *gasa4fin219-2* 則是具有更加抽長的下胚軸，可見 GASA4 與 FIN219 會分別影響 GA 促進下胚軸的過程。但在種子萌發率的測試中，在外加 PAC 處理下 *gasa4* 種子的萌發速度會較野生型來的慢，而 *fin219-2* 種子反而會較快萌發，*gasa4fin219-2* 則較類似 *fin219-2* 的性狀(圖四)。因此在種子萌發的過程中 GASA4 與 FIN219 又扮演相反的角色。

目前對於 FIN219 作用的推測為 GA 反應的負調控者，在外表型的檢測都一致顯示 *fin219-2* 突變株會對 GA 相關性狀呈現較敏感的現象，可見其應該是扮演抑制 GA 反應的作用。而 GASA4 的作用在外表型檢測的部分則不是很明確，但在基因表現結果顯示，外加 GA 下 GASA4 會抑制 *SPY* 及 *RGL3* 的表現(圖十一)，因此會對 GA 反應有促進的作用。但實驗室先前對於遠紅光訊息傳遞的研究顯示 GASA4 會抑制 GA 生合成基因 GA3 oxidase 的表現而抑制阿拉伯芥在遠紅光照射下下胚軸的延長(Chen et al., 2007a)，因此 GASA4 又會負調控 GA 反應。在此我們只能推論 GASA4 會藉由兩種不同路徑去影響 GA 反應，其一是調控 GA 生合成基因表現而影響植物內生性 GA 含量，其二則是調控 *RGL3* 基因的表現。

二、GASA4 與 FIN219 共同參與在茉莉酸訊息傳遞路徑

經由對 JA 相關性狀的觀察，我們同樣發現不同的組織中 GASA4 及 FIN219 的影響程度不同。在下胚軸及根長的抑制性測試中，*fin219-2* 突變株會較 *gasa4* 突變株具有較不敏感的外表型，而雙突變株 *gasa4fin219-2* 則較偏向於 *fin219-2* 的性狀(圖二；圖三；圖五)，可見在這兩種組織中 FIN219 扮演著主導的角色，GASA4 的影響並不明顯；在花青素累積的部分，在弱遠紅光下處理 MeJA，則

雙突變株 *gasa4fin219-2* 的花青素累積量會明顯少於 *gasa4* 及 *fin219-2* 突變株(圖四)，此時 FIN219 與 GASA4 比較像是經由不同調控路徑去影響相同性狀。

目前研究已知 FIN219 為 JA 反應的正調控者，在外表型的檢測都一致顯示 *fin219-2* 突變株會對 JA 相關性狀呈現較敏感的現象；而在基因檢測方面，*fin219-2* 突變株中 JA 生合成基因及訊息傳遞因子的表現較低(圖九；圖十)，也符合 FIN219 作為正調控者的推論。而 GASA4 的作用在外表型檢測的部分顯示，*gasa4* 突變株會對 JA 處理呈現些微不敏感的外表型，因此 GASA4 可能也是扮演著正調控者的角色。但在基因檢測部分則發現，在外加 MeJA 時 *gasa4* 突變株中 JA 生合成基因及訊息傳遞因子的表現都有上升的現象(圖九；圖十)，此外 *gasa4* 突變株中 *RGL3* 的表現量也會上升(圖十一)，而 *RGL3* 已知能藉由與 JAZ 的結合而促進 JA 反應(Wild et al., 2012)。因此 GASA4 應該是扮演負調控的角色。由於我們只觀察到 RNA 表現的層次，不清楚 GASA4 對 *RGL3* 蛋白質表現的影響為何，因此之後還要進行蛋白質表現量的檢測以更加了解 GASA4 的作用為何。

三、GASA4 能藉由多條路徑調控 GA 與 JA 訊息傳遞的交互作用

先前有研究提出 GASA 基因家族能藉由三種路徑去進行作用：(1) 氧化還原狀態的恆定(Redox homeostasis) (2) 荷爾蒙的恆定 (3) 調控 DELLA 基因表現(Nahirñak et al., 2012)。

GASA4 大量表現轉殖株在創傷處理下過氧化氫的累積量會比野生型低，因此 *GASA4* 具有抗氧化的功能。但若大量表現的是將保守序列置換後的片段，則抑制的效果變的不明顯，因此 *GASA4* 能藉由此保守序列影響氧化還原狀態的恆定，進而影響植物對於 GA 的反應 (Rubinovich and Weiss, 2010)。而氧化還原的恆定是否會影響到植物對 JA 的反應也是之後可以研究的目標。GASA 基因家族也能調節除了 GA 以外其他荷爾蒙的恆定，研究發現大量表現 *FsGASA4* 不但能增加內生 SA 的量，還能增加 SA 生合成及訊息傳遞基因的表現(Alonso-Ramírez

et al., 2009)。我們的研究則發現 GASA4 會影響 JA 生合成基因及訊息傳遞基因的表現，因此 GASA4 也可能藉由影響內生 JA 的含量去影響 JA 反應。最近也有幾篇研究指出，GASA 基因家族會影響 DELLA 基因表現。AtGASA5 能藉由促進 GAI 的表現去負調控開花(Zhang et al., 2009)。GsGASA1 會促進 RGL2 及 RGL3 的表現，進而影響慢性冷處理對根的抑制性(Li et al., 2011)。在我們的研究則發現 AtGASA4 會抑制 RGL3 的表現(圖十一)，而 RGL3 已知會參與在 GA 及 JA 訊息傳遞路徑中(Wild et al. 2012)。因此推測 GASA4 可能藉由調控 RGL3 的表現去影響 GA 及 JA 反應。除此之外我們也發現 GASA4 在 MeJA 處理下會影響 SPY 的表現(圖十一)。

在沒有 GA 存在的情形下，SPY 能對 DELLA 蛋白進行糖基化作用，而使其具有活性去抑制 GA 下游基因的表現，而當外加 GA 時，SPY 的活性會受到抑制，使 DELLA 蛋白無法被活化而無法抑制，此 GA 下游基因能正常表現(Tseng et al., 2001)。由此結果推測在外加 JA 時，GASA4 也能藉由影響 SPY 基因表現去影響 DELLA 蛋白的活性。

四、遠紅光的強弱會造成對 GA 及 JA 反應的影響不同

不同光強度的遠紅光照射會使植物對 GA 及 JA 反應的影響不同。在下胚軸的觀察(圖三)中，各突變株只有在遠紅光照射下處理 GA₃ 才會具有較延長的胚軸，顯示 GASA4 及 FIN219 要在遠紅光照射下才會影響 GA 反應，而強遠紅光下的促進百分比又明顯高於弱遠紅光，因此遠紅光能促進植物的 GA 反應。而各突變株只有在黑暗及弱遠紅光照射下處理 MeJA 才會具有較延長胚軸(圖三)，顯示 GASA4 及 FIN219 同樣要在特定的照射環境下才會影響 JA 反應。此外在黑暗及弱遠紅光照射下同時外加 GA₃ 及 MeJA 所造成的影響會類似於單純加 MeJA；但在強遠紅光下同時外加 GA₃ 及 MeJA 所造成的影響會類似於單純加 GA₃(圖三)。在花青素累積的觀察中，則只有在強遠紅光照射時 GA 處理才會抑制花青素累積

(圖四)。而各突變株在黑暗及弱遠紅光照射下，在處理 MeJA 下都較野生型具有較少的花青素累積，但在強遠紅光照射下則與野生型沒有顯著差異(圖四)。會造成這樣的性狀可能是因 GASA4 與 FIN219 在不同的遠紅光強度條件下的表現量不同有關。



結論與未來展望

根據所得的研究結果，我們推論出 GASA4 與 FIN219 的可能調控模式圖(圖十二)：外加 GA 能促進 GASA4 的表現，GASA4 能藉由抑制 FIN219 的表現而抑制 JA 反應，此外 GASA4 本身也能藉由抑制 *RGL3* 的基因表現而促進 GA 反應的進行，兩條路徑的共同調控使植物最終偏向於進行 GA 所調控的生長發育反應；外加 MeJA 則是會促進 FIN219 的表現，FIN219 本身能促進 JA 反應，而其又能藉由抑制 GASA4 的表現而抑制 GASA4 對於 *SPY* 及 *RGL3* 基因的抑制作用，兩條路徑的共同調控使植物最終偏向進行 JA 所調控的防禦反應。

本實驗以 RT-PCR 觀察在外加 GA₃ 及 MeJA 的情形下，GASA4 與 FIN219 對於 JA 生合成基因、JA 訊息傳遞因子及 GA 相關基因表現之影響，但差異性並不是很明顯，建議之後能以 qPCR 再次驗證，或是利用抗體直接觀察蛋白質表現量。此外我們也發現 GASA4 會影響 JA 生合成基因表現，推測 GASA4 能藉由影響植物體內 JA 生合成以調控 JA 反應，因此之後可直接偵測內生 JA 含量，以證實此推論。在 GASA4 及 FIN219 彼此調控及外加 GA₃ 或 MeJA 對兩者表現量之調控的部分，基因表現結果與蛋白質表現有些出入，推測可能還有其他後轉譯修飾作用共同調控，因此之後可再檢測 GASA4 及 FIN219 是否影響蛋白質降解或磷酸化過程。

Chapter II



Functional Studies of *GASA4* in Infrared light signaling in *Arabidopsis*

阿拉伯芥 *GASA4* 在紅外光訊息傳遞中的功能性研究

結果



一、PSAK 大量表現轉殖株在紅外光照射下呈現較長下胚軸的外表型

為了瞭解 PSAK 是否也會參與在紅外光影響下胚軸長度的路徑中，第一步要先建構 PSAK 大量表現(over-express)及降低表現(knock-down)的轉殖株。由於 PSAK 基因的兩端設計為相同切位(*Bam*HI)，因此會以正接(sense)及反接(antisense)的形式插入含 *CaMV35S* 的質體當中，此時若插入的為正接的 PSAK 基因，則會大量產生正常的 PSAK mRNA，此即為 overexpression line (*pCaMV35S::PSAK*)；但若大量表現的是反接的 PSAK 基因，則大量表現的 antisense RNA 會與內生性 mRNA 結合而成為 dsRNA，最後會被 Dicer 切斷失去作用，使 PSAK 表現量降低，此即為 knock-down line (*pCaMV35S::PSAKAS*)。

將建構好的質體利用農桿菌轉入阿拉伯芥植株，並篩選到 T3 為同型合子的轉殖株，並利用 RT-PCR 確定各轉殖株的基因表現量(圖十三 A~B)。將野生型 Col 及各轉殖株種植在 0.3%GM 培養基，放置於黑暗及 3~5 μ m 紅外光照射下生長後，觀察其下胚軸長度，紅外光照射條件則比照先前對 *gasa4* 突變株的處理方式，為模擬 end-of-day 光照模式。結果顯示在紅外光照射下 *pCaMV35S::PSAK* 會具有較野生型 Col 長的下胚軸，而 *pCaMV35S::PSAKAS* 的下胚軸長度則與野生型無顯著差異(圖十三 E~F)。由於紅外光會抑制下胚軸延長，因此 PSAK 可能扮演負調控者的角色。

二、NPQ4 大量表現的轉殖株在紅外光照射下同樣呈現較長下胚軸的外表型

為了瞭解 NPQ4 是否也會同樣參與在紅外光影響下胚軸長的路徑中，同樣也先建構 NPQ4 大量表現(over-express)及降低表現(knock-down)的轉殖株。利用 RT-PCR 確定基因表現量(圖十三 C~D)，並觀察兩種轉殖株在黑暗及 3~5 μ m 紅外光照射下的下胚軸長度。結果顯示在紅外光照射下 *pCaMV35S::NPQ4* 會具有

較野生型 Col 長的下胚軸，而 *pCaMV35S::NPQ4AS* 則具有較野生型短縮的下胚軸(圖十三 G~H)，因此 NPQ4 可能同樣也扮演負調控者的角色。



三、在 *gasa4* 突變株背景下的轉殖株會恢復成如同野生型的外表型

為了瞭解 GASA4 與 PSAK 及 NPQ4 在紅外光訊息傳遞路徑中的關係，將建構好的質體同樣轉到 *gasa4* 突變株中，以建構具有 *gasa4* 突變株背景的 PSAK 及 NPQ4 轉殖株。同樣利用 RT-PCR 確認基因表現量(圖十四 A~C)。原先大量表現 PSAK 會具有長下胚軸的外表型，但若大量表現在 *gasa4* 突變株背景 (*pCaMV35S::PSAK/gasa4*)則與野生型無顯著差異 (圖十四 D~E)。原先降低 NPQ4 的表現會使其在紅外光下具有較短縮的下胚軸，但 *pCaMV35S::NPQ4AS/gasa4* 的下胚軸長度卻與野生型無顯著差異(圖十四 D~E)。由以上結果推測，在紅外光下 PSAK 及 NPQ4 必須要在具有正常功能的 GASA4 存在時才能行使其負調控下胚軸延長的作用。

四、紅外光能促進 C4 植物 PEP carboxylase 基因的表現

我們利用 C4 植物玉米作為材料，觀察在紅外光照射下，其 *PEP carboxylase* (*PEPC*)基因的表現量是否受到改變。由於 *PEPC* 主要會在葉部表現，我們將七天大的玉米幼苗葉片以打洞機打洞，形成玉米的葉圓體(leaf disc)。將葉圓體平鋪在 0.3%GM 培養基上，放置於黑暗或 3~5 μm 紅外光下培養五天後，測量其 *PEPC* 基因的表現量。結果如圖十五(D)所示，在紅外光照射下培養的葉圓體其 *PEPC* 基因表現量高於在黑暗中培養的對照組，因此推測紅外光能促進 *PEPC* 基因的表現。

五、紅外光能影響葉綠素含量

在觀察黑暗及紅外光培養的葉圓體外表型時發現，在紅外光下的葉圓體似乎比在黑暗中的葉圓體還要綠(圖十五 C)。為了釐清紅外光照射是否也會影響到葉綠素的含量，我們收集這兩種處理下的植物材料進行葉綠素的萃取。結果顯示在紅外光下的玉米葉圓體中葉綠素的含量確實高於在黑暗中的葉圓體(圖十五 A)；以阿拉伯芥葉片作為材料時也得到同樣的結果(圖十五 B)。

討論

一、PSAK、NPQ4 及 GASA4 共同參與紅外光抑制下胚軸延長的路徑中

在紅外光照射下植物會呈現較短縮的下胚軸，代表紅外光的作用類似於可見光，能促進光型態發生的進行。*gasa4* 突變株在紅外光下呈現較長下胚軸的外表型，因此推測 GASA4 是扮演正調控的角色，能促進紅外光對下胚軸延長的抑制性。而利用 microarray 所篩選出的會受紅外光誘導產生的 PSAK 及 NPQ4，則是扮演負調控者的角色，因為從實驗結果發現大量表現 PSAK 及 NPQ4 的轉殖株在紅外光照射下會有較長下胚軸的外表型，相反的大量表現 NPQ4AS 能使其在紅外光照射下呈現短下胚軸的外表型(圖十三)。但當我們將 *gasa4* 突變株作為轉殖的背景時則發現，PSAK 與 NPQ4 的調控作用變得較不明顯(圖十四)，可見 PSAK 與 NPQ4 的調控作用必須要在具有正常功能的 GASA4 存在的情形下才能作用。檢測基因表現時則發現 *gasa4* 突變株中 PSAK 基因表現會略高於野生型，而 NPQ4 則略低於野生型，因此 GASA4 會影響 PSAK 及 NPQ4 的表現。綜合以上觀察結果推測 GASA4 與 PSAK 或 NPQ4 可能參與在相同調控路徑中，而 GASA4 可能藉由調控 PSAK 及 NPQ4 的基因表現去影響其在紅外光照射下的外表型。

二、紅外光照射能促進植物的光合作用效率

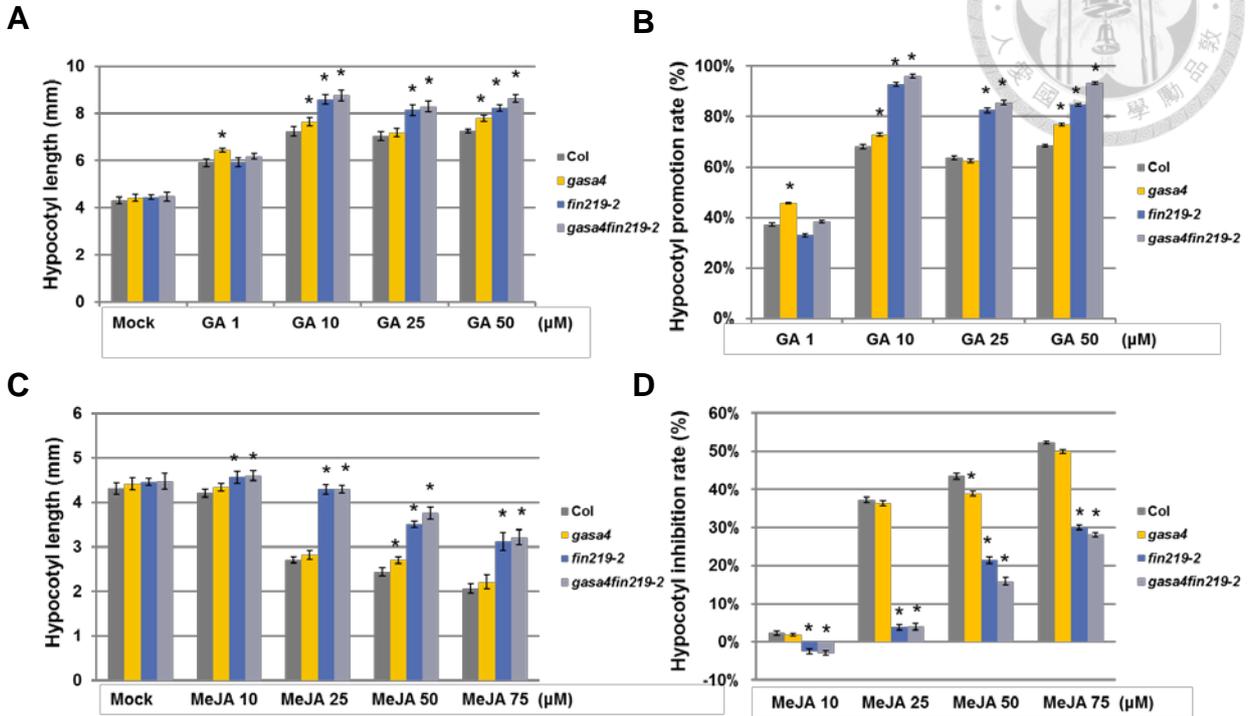
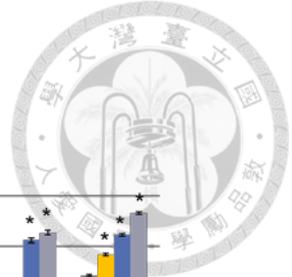
實驗室先前的研究發現，在 *in vitro* 的條件下紅外光照射能增加玉米 PEP carboxylase 的活性，為了瞭解在生物體中的 PEP carboxylase 是否也會受到紅外光的影響，我們利用 RT-PCR 檢測在黑暗及 3~5 μm 紅外光下生長的阿拉伯芥幼苗中 PEPC 基因的表現，結果顯示紅外光的照射能促進植株 PEPC 基因的表現，但差異性並不明顯，因此後續必須進一步利用抗體來檢驗其蛋白質層次的表現，或將植物體內的總蛋白萃取出來，進行酵素活性的測試。

三、紅外光照射能延緩植物葉的老化

除了對光合作用的影響外，我們也發現在紅外光照射下的玉米及阿拉伯芥葉圓體葉綠素含量較高。為了更加了解紅外光的作用機制為何，之後可檢測一些葉綠素生合成基因或老化相關基因的表現。若能證實紅外光確實能延緩植物葉部的老化，未來可將紅外光應用於葉菜類蔬菜的保鮮，以增加冰箱中蔬菜的儲藏時間。



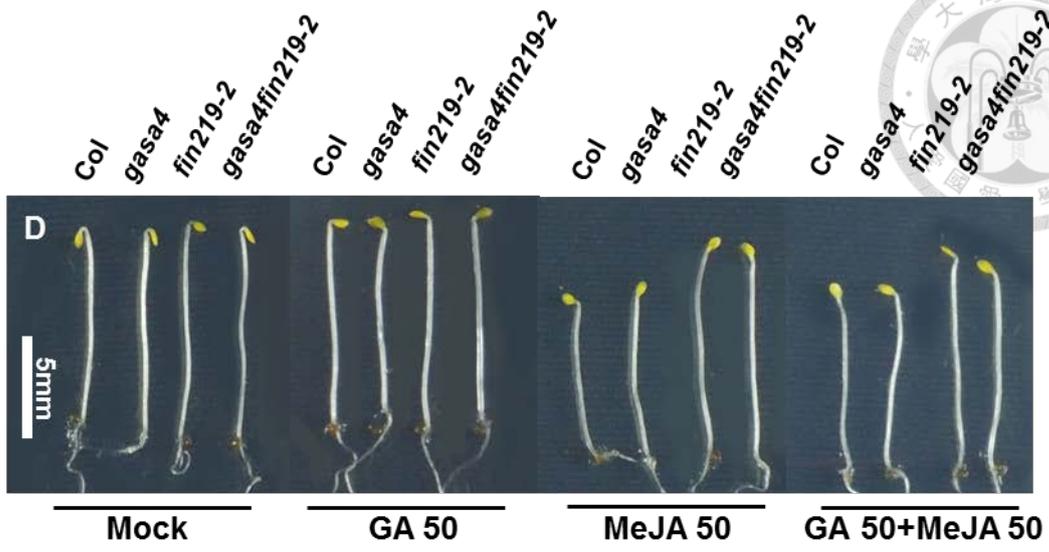
結果圖表



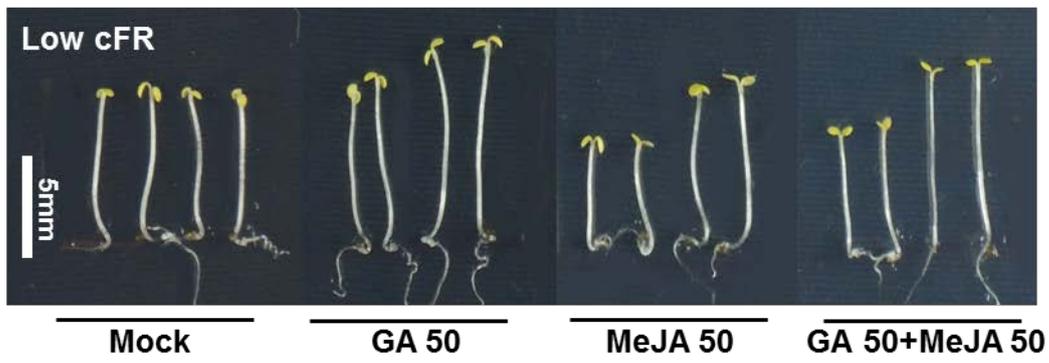
圖一、比起野生型，*gasa4*、*fin219-2* 與 *gasa4fin219-2* 具有對 GA 促進下胚軸延長較敏感的外表型，而對 MeJA 抑制下胚軸延長則具有較不敏感的外表型

將各植株分別種植於含不同濃度的 GA_3 (A)及不同濃度的 MeJA (B)上，在 $9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 遠紅光下生長三天後，測量植株之下胚軸長度。實驗皆經過三重複 (n=30)。(B、D)為(A、C)換算成抑制百分比後的結果 (*表示經 T-test 統計分析後有顯著差異者， $P \leq 0.05$)。

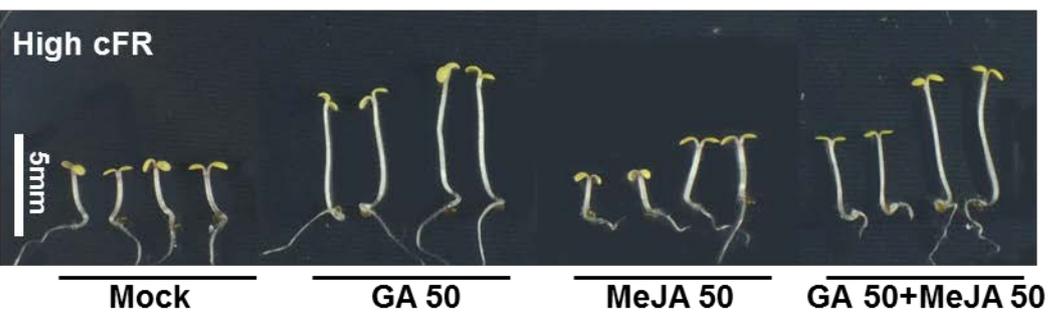
A



B

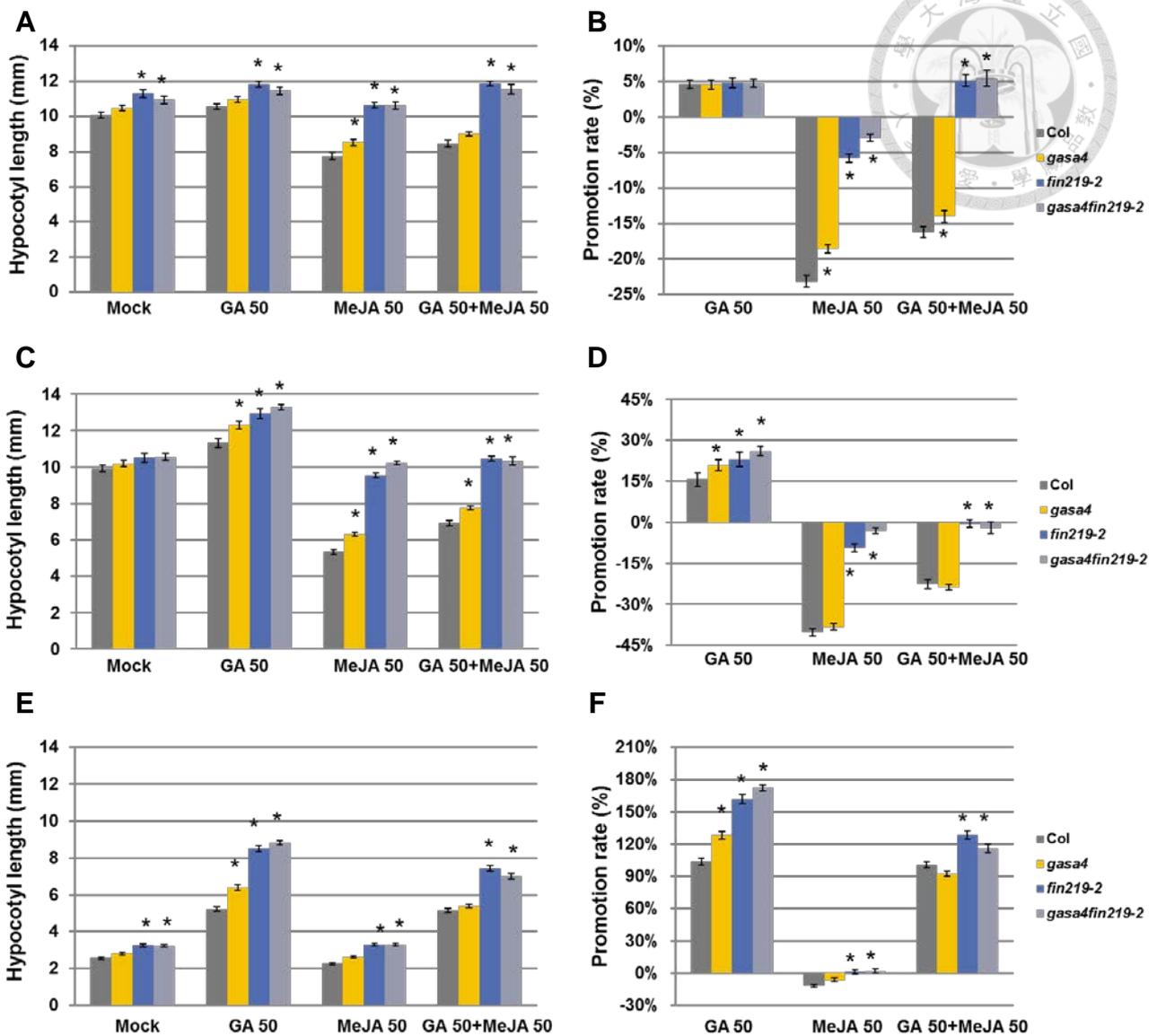


C



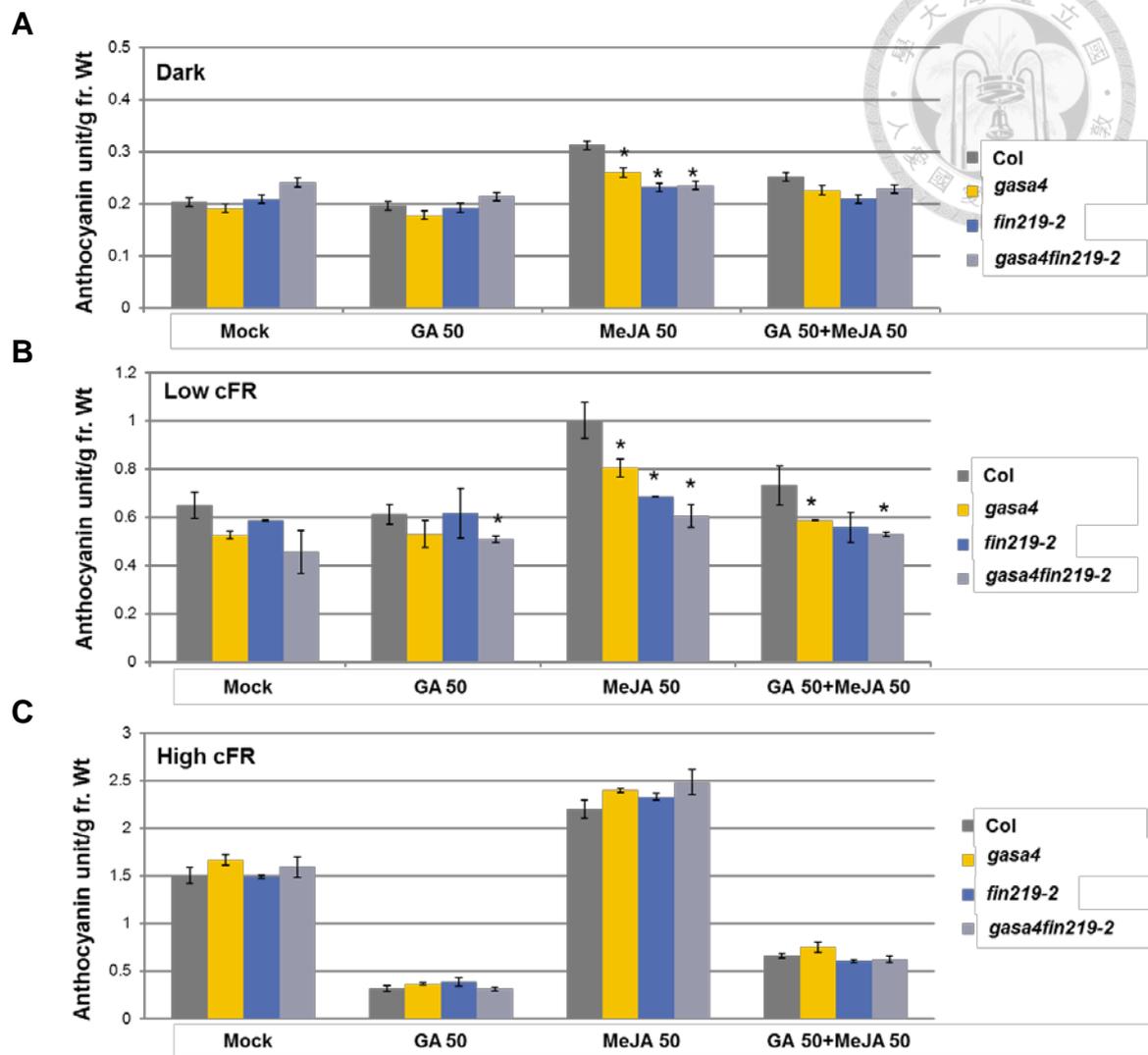
圖二、在遠紅光下 GA 會促進下胚軸的延長，而 MeJA 則是在黑暗及遠紅光下都會抑制下胚軸的延長。

將各植株分別種植在不添加、只含 50 μM GA_3 、只含 50 μM MeJA 以及兩者均添加的 0.3% GM 培養基，在黑暗(A)、弱遠紅光(B)及強遠紅光(C)下生長三天後，測量植株之下胚軸長度。(弱遠紅光之光強度為 1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ；強遠紅光為 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (cFR: continuous far-red light)



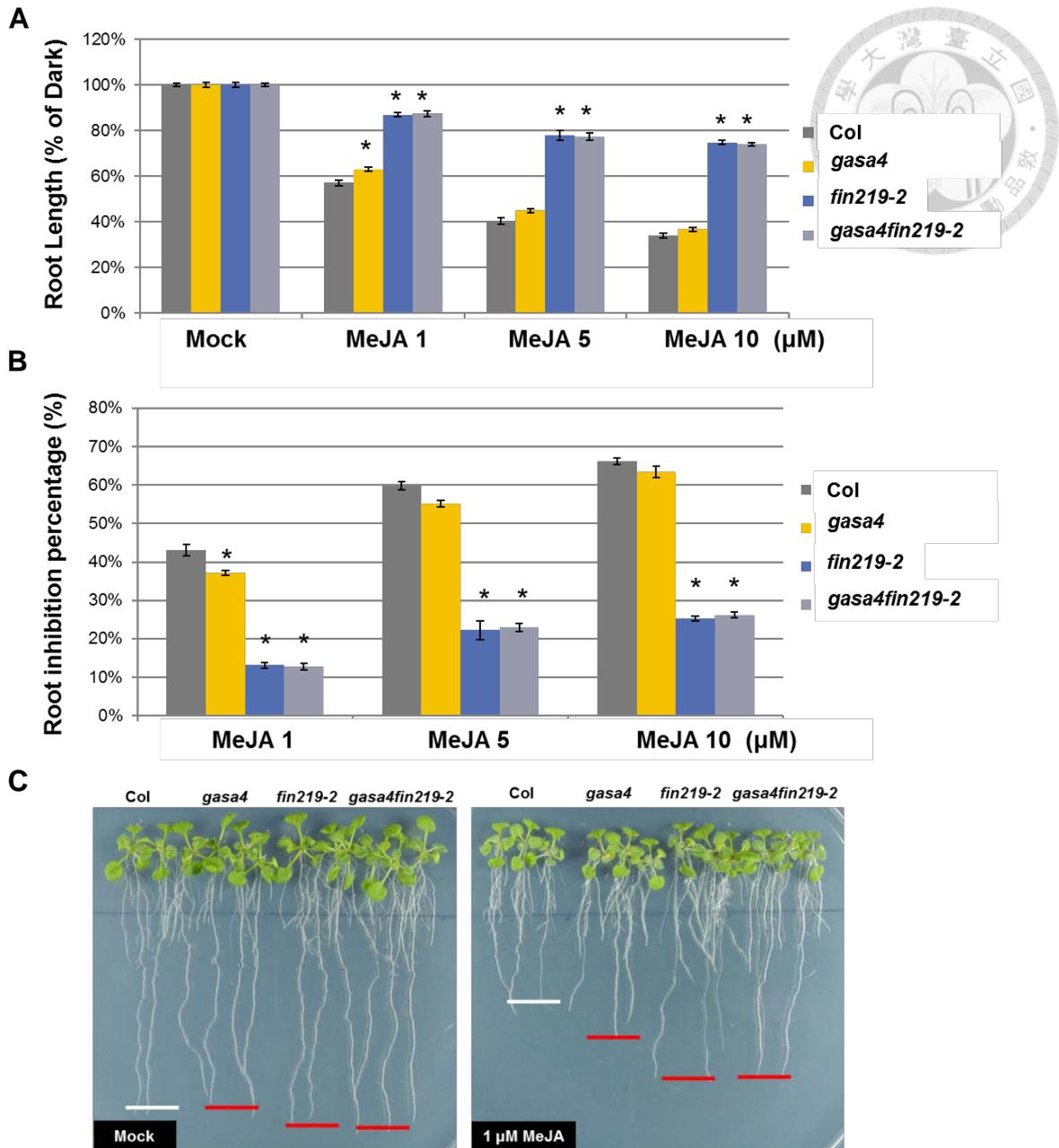
圖三、在遠紅光下 *gasa4*、*fin219-2* 與 *gasa4fin219-2* 具有對 GA 促進下胚軸長較敏感的外表型，而無論是在黑暗或遠紅光下都對 MeJA 抑制下胚軸生長具有較不敏感的外表型

處理條件同圖二。將各植株分別種植在不添加、只含 50 μM GA₃、只含 50 μM MeJA 以及兩者均添加的 0.3% GM 培養基，在黑暗(A、B)、弱遠紅光(C、D)及強遠紅光(E、F)下生長三天後，測量植株之下胚軸長度。實驗皆經過三重複(n=30)。(A、C、E)圖為長度統計圖；(B、D、F)圖為換算後之抑制百分比統計圖。(*表示經 T-test 統計分析後有顯著差異者， $P \leq 0.05$)



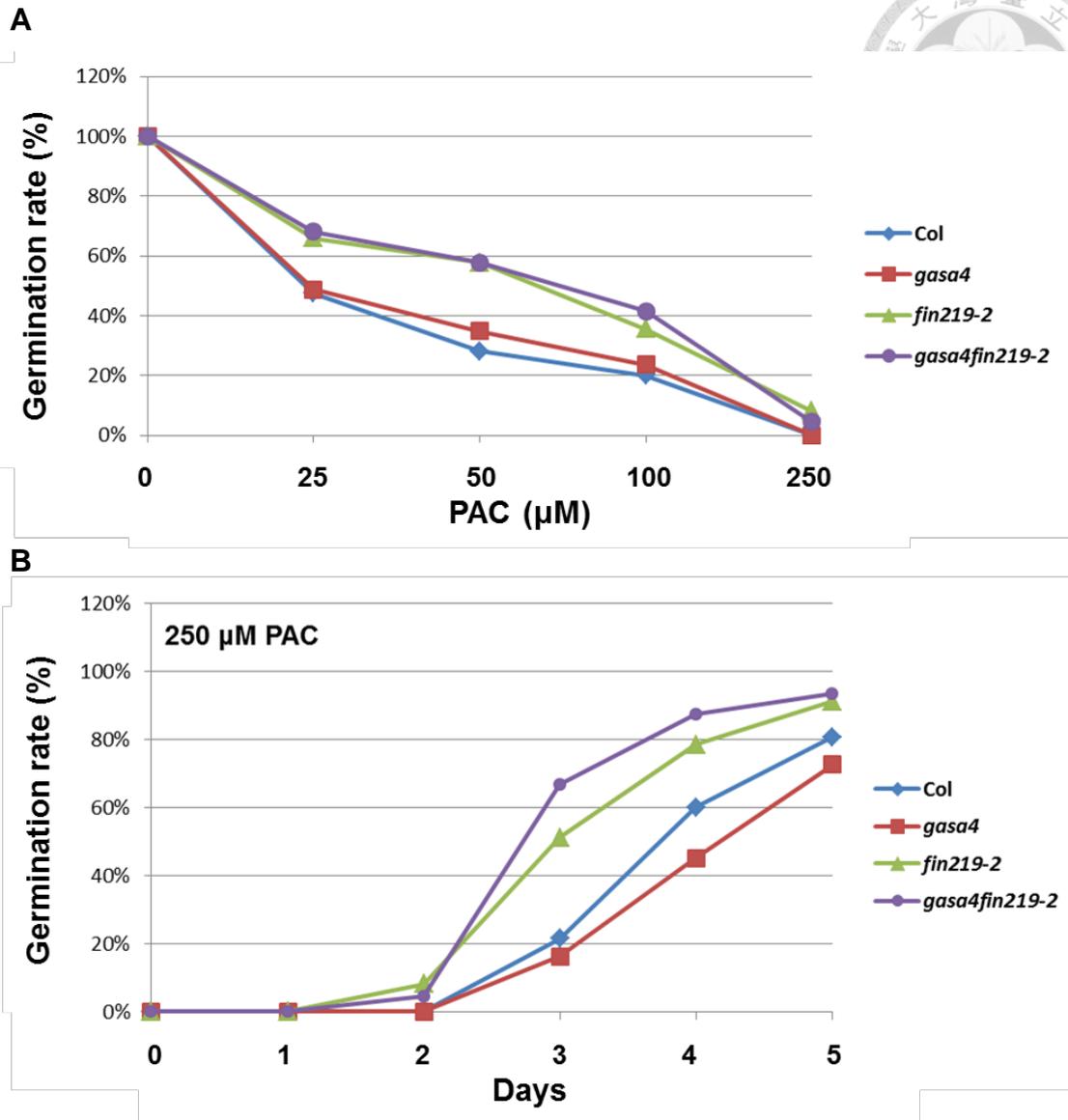
圖四、在黑暗及弱遠紅光下，*gasa4*、*fin219-2* 與 *gasa4fin219-2* 無法受到 MeJA 誘導而正常累積花青素

將各植株分別種植在不添加、只含 50 μM GA₃、只含 50 μM MeJA 以及兩者均添加的 0.3% GM 培養基，在黑暗(A)、弱遠紅光(B)及強遠紅光(C)下生長三天後，測量植株之花青素累積。實驗皆經過三重複(n=30)。(光強度分別為弱遠紅光 1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ；強遠紅光 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (*表示經 T-test 統計分析後有顯著差異者， $P \leq 0.05$)



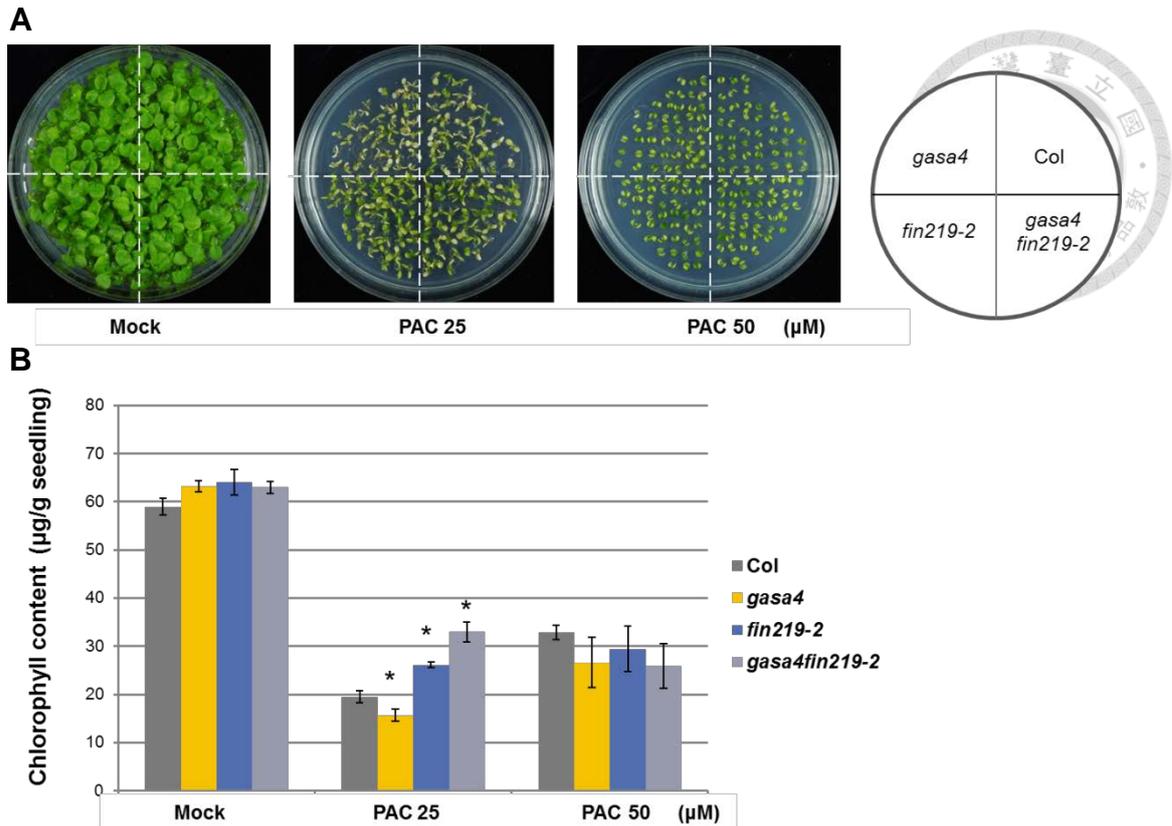
圖五、*gasa4*、*fin219-2* 與 *gasa4fin219-2* 均有對 JA 抑制根長較不敏感的外表型

將在 0.3% GM 培養基上生長七天的植株移至含不同濃度 MeJA (0、1、5、10 μM) 的 0.3% GM 培養基後，垂直培養於白光五天後，測量其根長長度，實驗均經過三重複(n=15)。(A)圖為長度統計圖；(B)圖為在 MeJA 處理下的抑制百分比統計圖；(C)圖為在不含 MeJA 及含 1 μM MeJA 培養基上生長的植株照片。(*表示經 T-test 統計分析後有顯著差異者， $P \leq 0.05$)



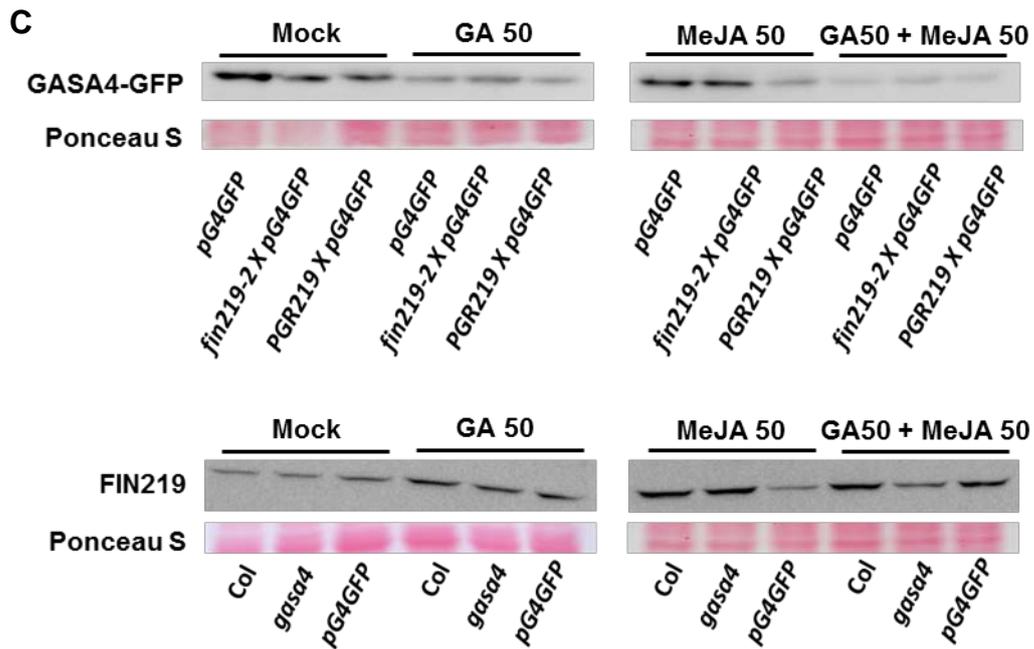
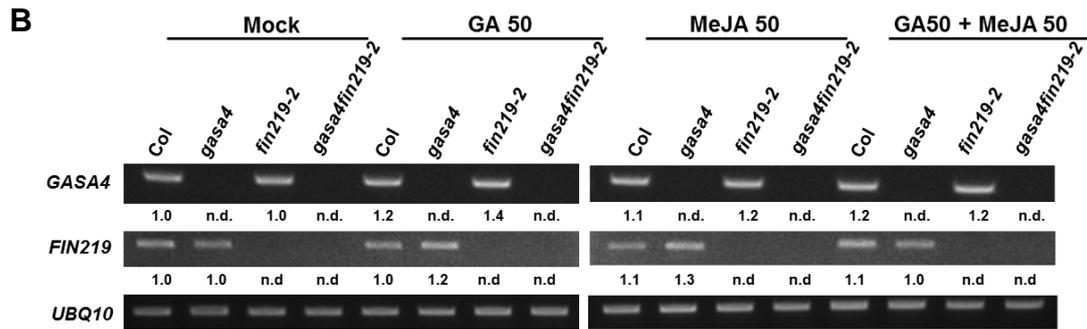
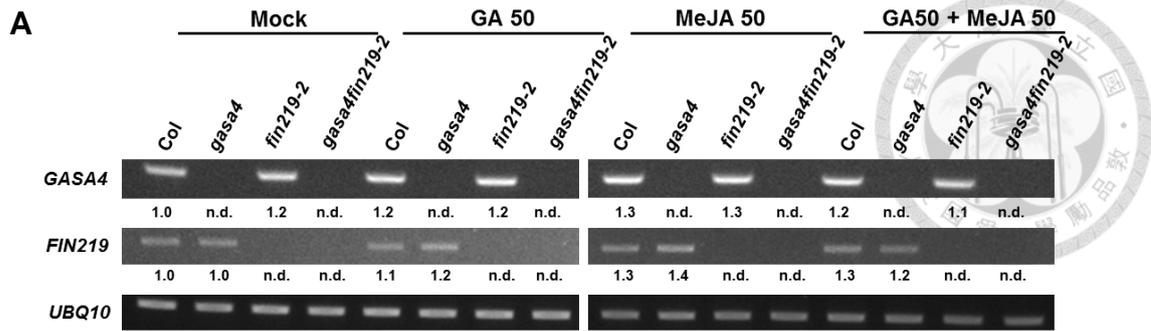
圖六、在 PAC 處理下 *fin219-2* 及 *gasa4fin219-2* 均較野生型提早萌發

將 100 顆各突變株之種子播撒在 0.3% GM 及含有不同濃度 PAC (25、50、100、250 μM) 的 GM 培養基上，置於 4°C 黑暗冷處理 3 天後，轉移至 22°C 白光生長，觀察種子發芽率。A 圖為各濃度在第二天的發芽率；B 圖為種子在 250 μM PAC 的 GM 培養基上第一到五天的發芽率。發芽率的算法為將已發芽的種子數除以種子總數。PAC 為 GA 生合成抑制劑。



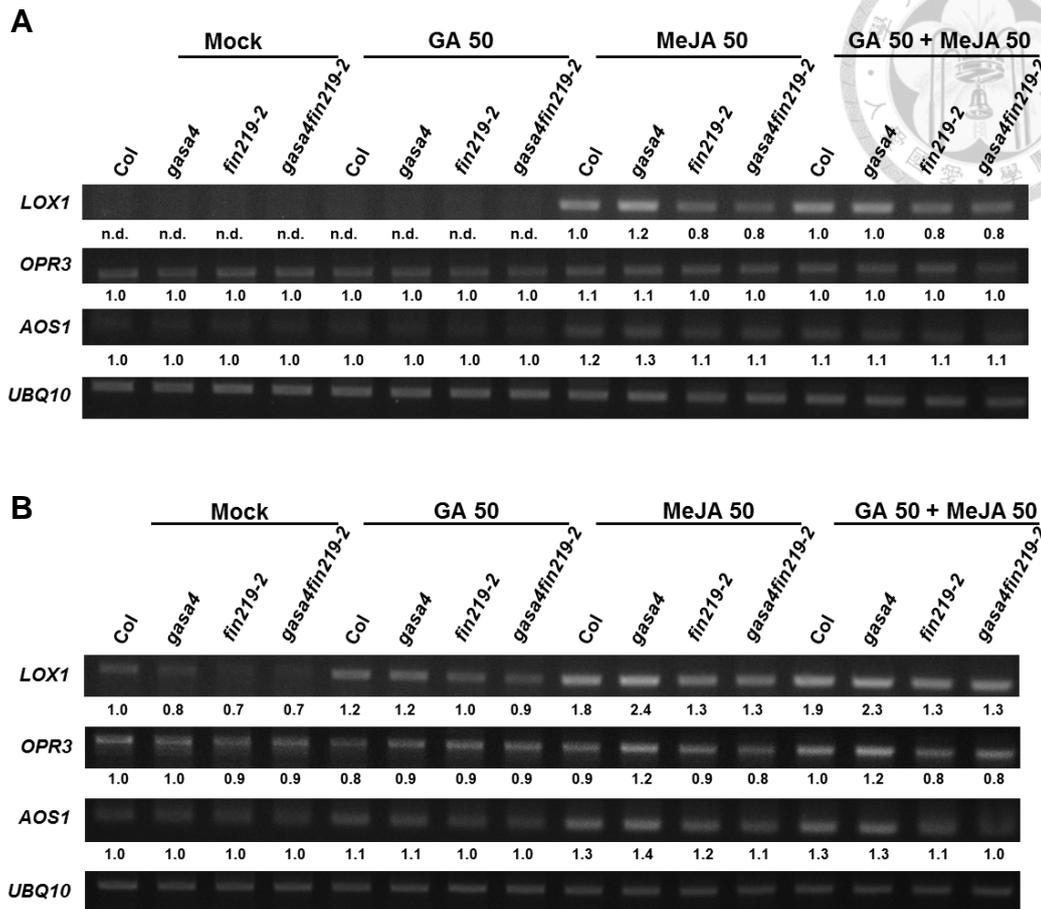
圖七、在 25 μM PAC 處理下 *gasa4* 突變株的葉綠素含量較野生型少，而 *fin219-2* 及 *gasa4fin219-2* 則較野生型多

處理條件同圖六。將各突變株之種子播撒在 0.3%GM 及含有不同濃度 PAC (25、50 μM) 的 GM 培養基上，置於 4 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗冷處理 3 天後，轉移至 22 $^{\circ}\text{C}$ 白光生長 15 天後，觀察其葉綠素含量。圖 A 為第 15 天的生長情形；圖 B 則是測量第 15 天時植株的其葉綠素含量(n=30)。(*表示經 T-test 統計分析後有顯著差異者， $P \leq 0.05$)



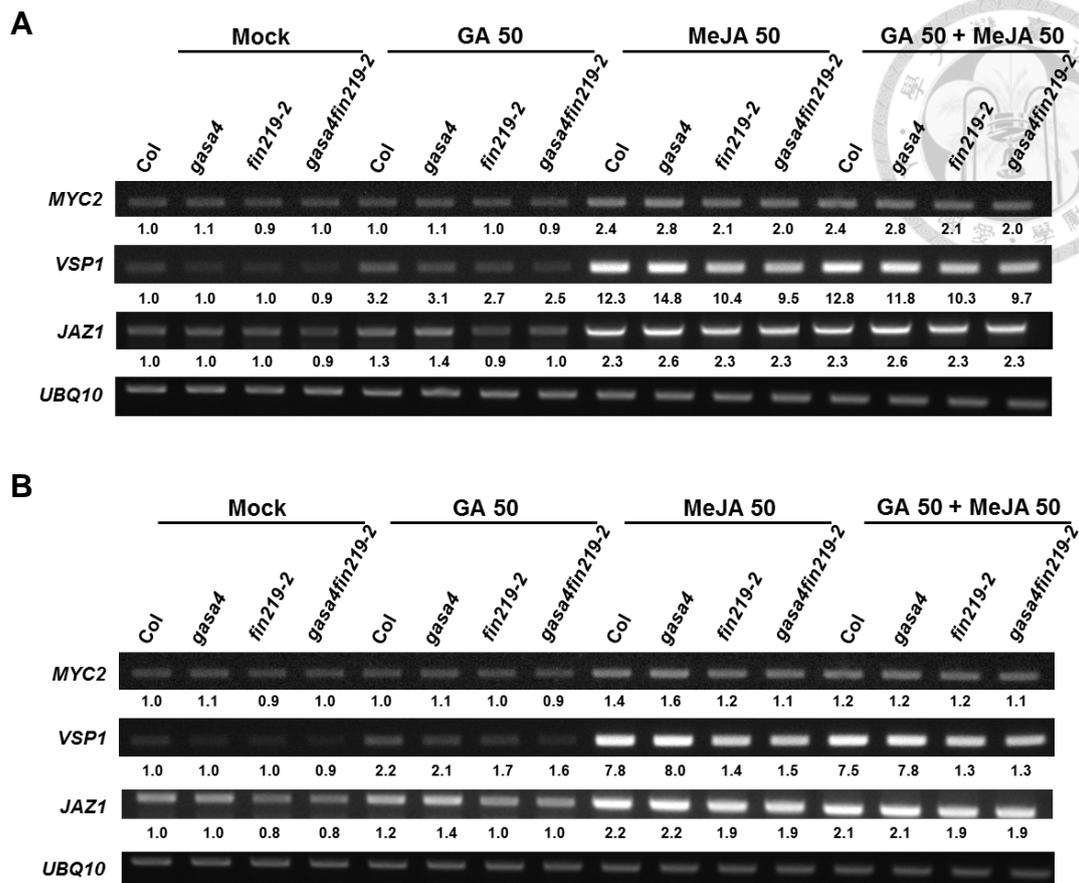
圖八、外加 50 μM MeJA 時，FIN219 會負調控 GASA4 的表現；而外加 50 μM GA₃ 時，GASA4 則會負調控 FIN219 的表現

將各植株分別種植在不添加、只含 50 μM GA₃、只含 50 μM MeJA 以及兩者均添加的 0.3% GM 培養基，在黑暗(A)及遠紅光(B)下生長三天後，抽取其 RNA 作基因表現檢測(遠紅光強度為 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)。每一列的數字代表該基因在不同處理下的相對表現量(將 Mock 組中野生型 Col 的表現量設為 1)。圖(C)則是以 western blot 檢測相同處理條件時，在遠紅光下生長三天後植株中 GASA4 及 FIN219 的蛋白質表現量。Ponceau S 染色作為 loading control。



圖九、外加 50 μM MeJA 時，GASA4 會負調控 JA 生合成基因的表現，而 FIN219 則是正調控的作用

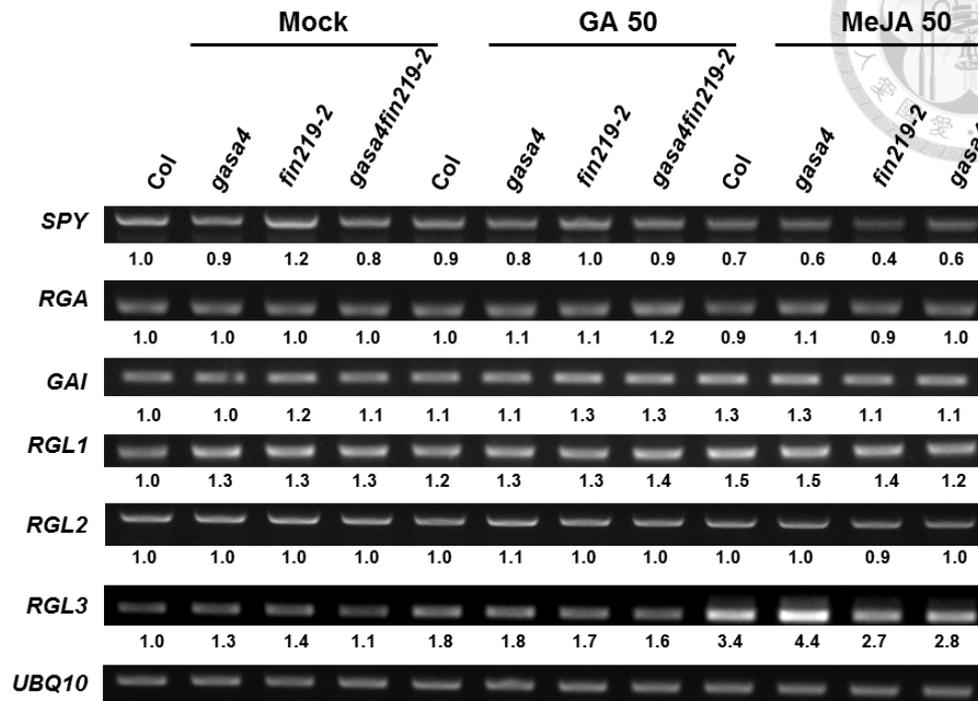
將各植株分別種植在不添加、只含 50 μM GA₃、只含 50 μM MeJA 以及兩者均添加的 0.3% GM 培養基，在黑暗(A)及遠紅光(B)下生長三天後，抽取其 RNA 作基因表現檢測。每一列的數字代表該基因在不同處理下的相對表現量(將在 Mock 組中野生型 Col 的表現量設為 1)。在 50 μM MeJA 處理下的 *gasa4* 突變株中 JA 生合成基因的表現都高於野生型，而 *fin219-2* 則是都低於野生型。



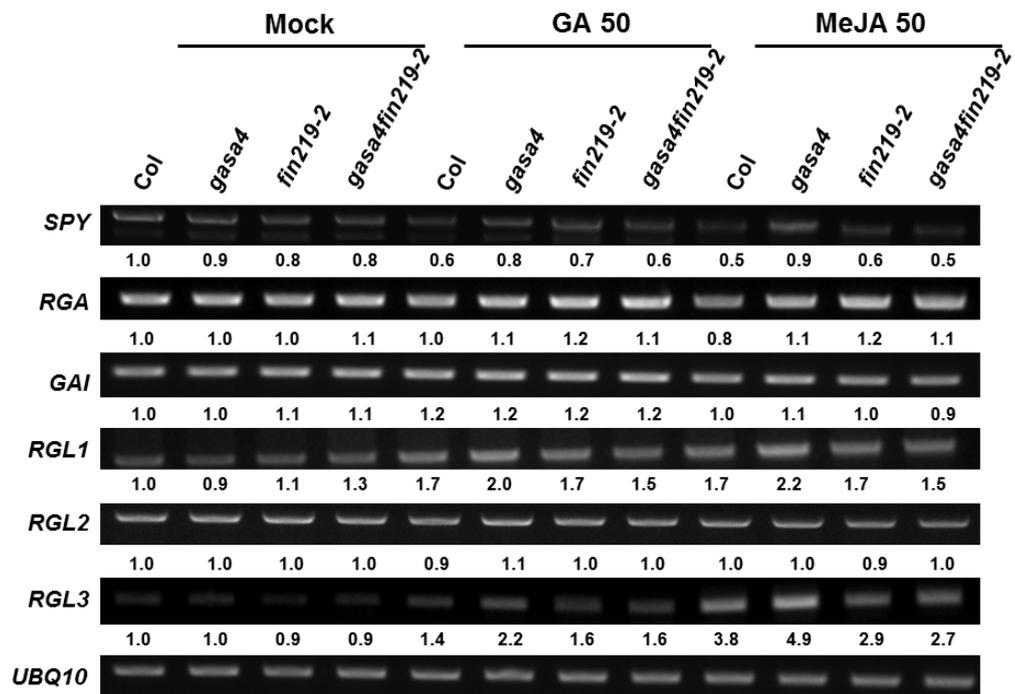
圖十、外加 GA₃ 及 MeJA 時，GASA4 均會負調控 JA 訊息傳遞因子的表現而 FIN219 則是正調控的作用

處理條件同圖八(A、B)。將各植株分別種植在不添加、只含 50 μM GA₃、只含 50 μM MeJA 以及兩者均添加的 0.3% GM 培養基，在黑暗(A)及遠紅光(B)下生長三天後，抽取其 RNA 作基因表現檢測。每一列的數字代表該基因在不同處理下的相對表現量(將在 Mock 組中野生型 Col 的表現量設為 1)。無論是處理 GA 或 MeJA，*gasa4* 突變株中 JA 訊息傳遞因子的表現都高於野生型，而 *fin219-2* 則是都低於野生型。

A



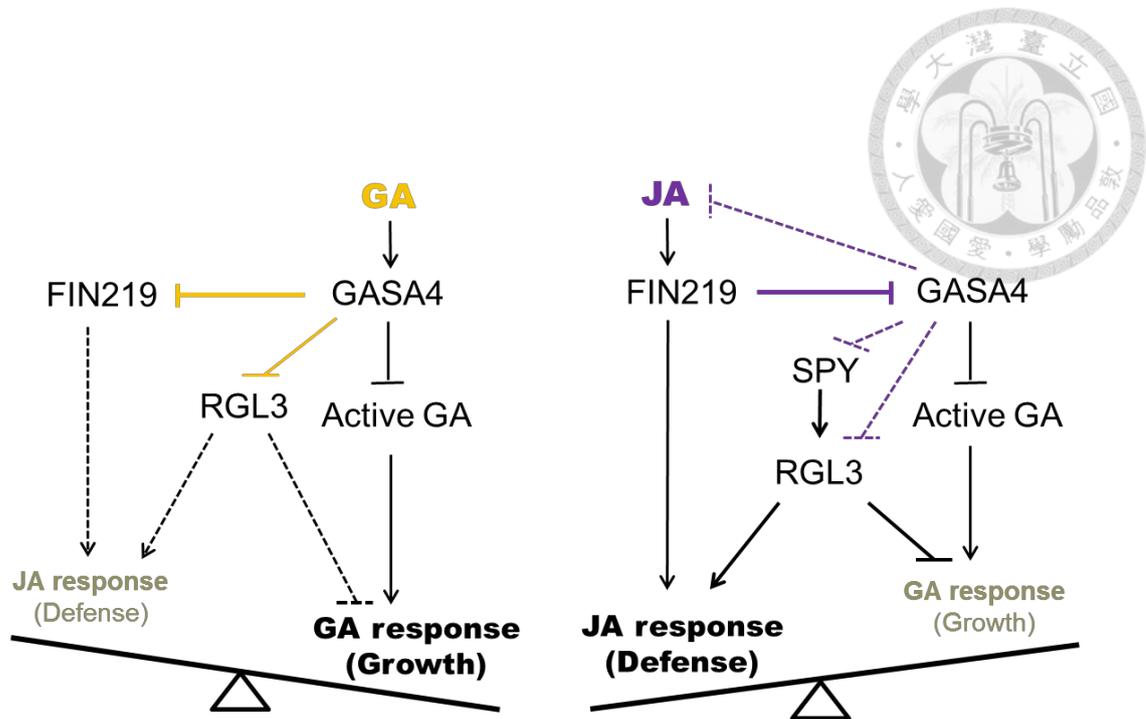
B



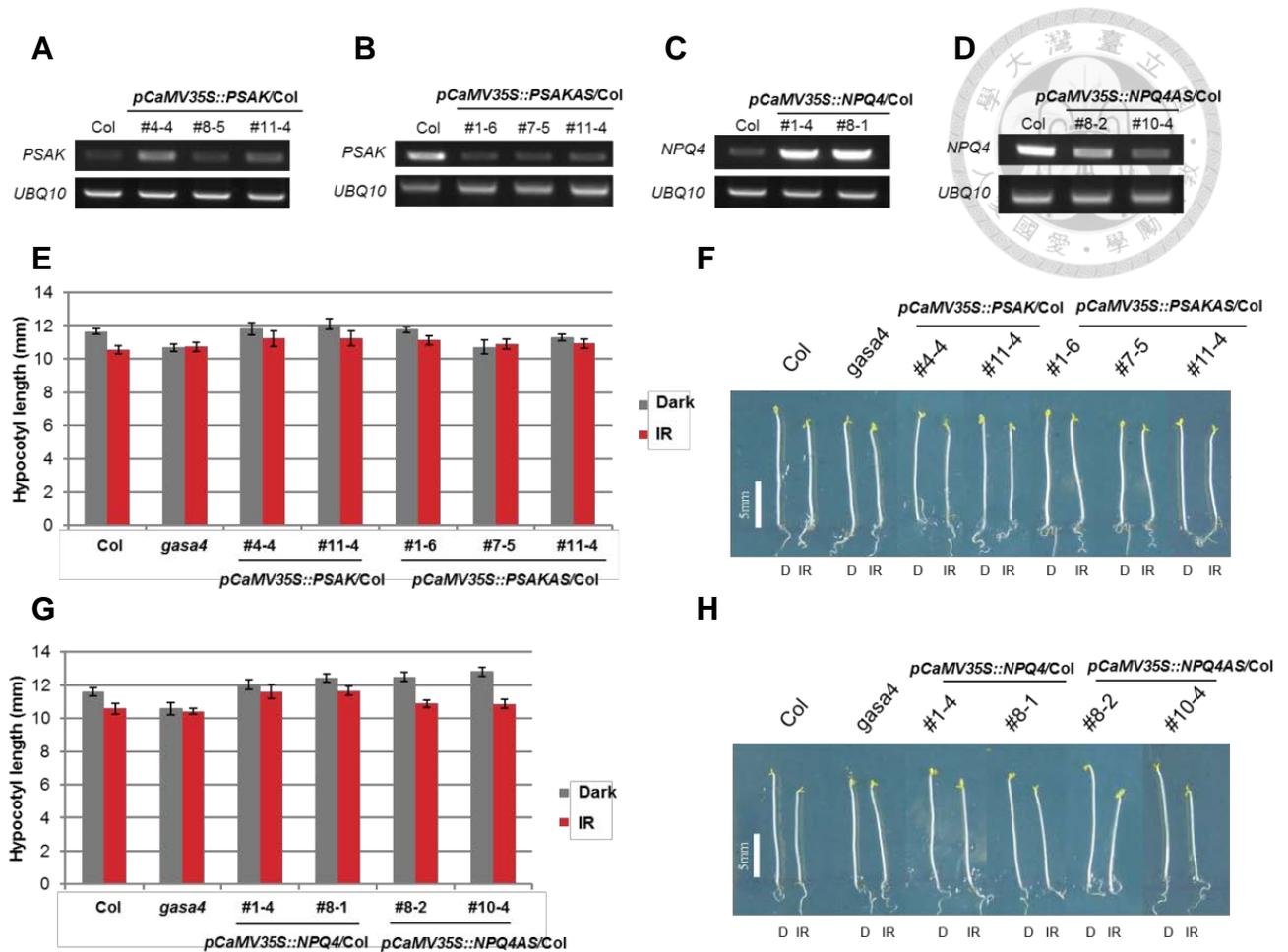


圖十一、外加 MeJA 時，GASA4 會負調控 *RGL3* 及 *SPY* 的表現，而 *FIN219* 則會正調控 *RGL3* 的表現

處理條件同圖八(A、B)。將各植株分別種植在不添加、只含 50 μM GA_3 及只含 50 μM MeJA 的 0.3% GM 培養基，在黑暗(A)及遠紅光(B)下生長三天後，抽取其 RNA 作基因表現檢測。每一列的數字代表該基因在不同處理下的相對表現量(將在 Mock 組中野生型 Col 的表現量設為 1)。在 MeJA 處理下，*gasa4* 突變株中 *RGL3* 及 *SPY* 基因的表現都高於野生型，而 *fin219-2* 突變株中則是只有 *RGL3* 的表現會低於野生型。

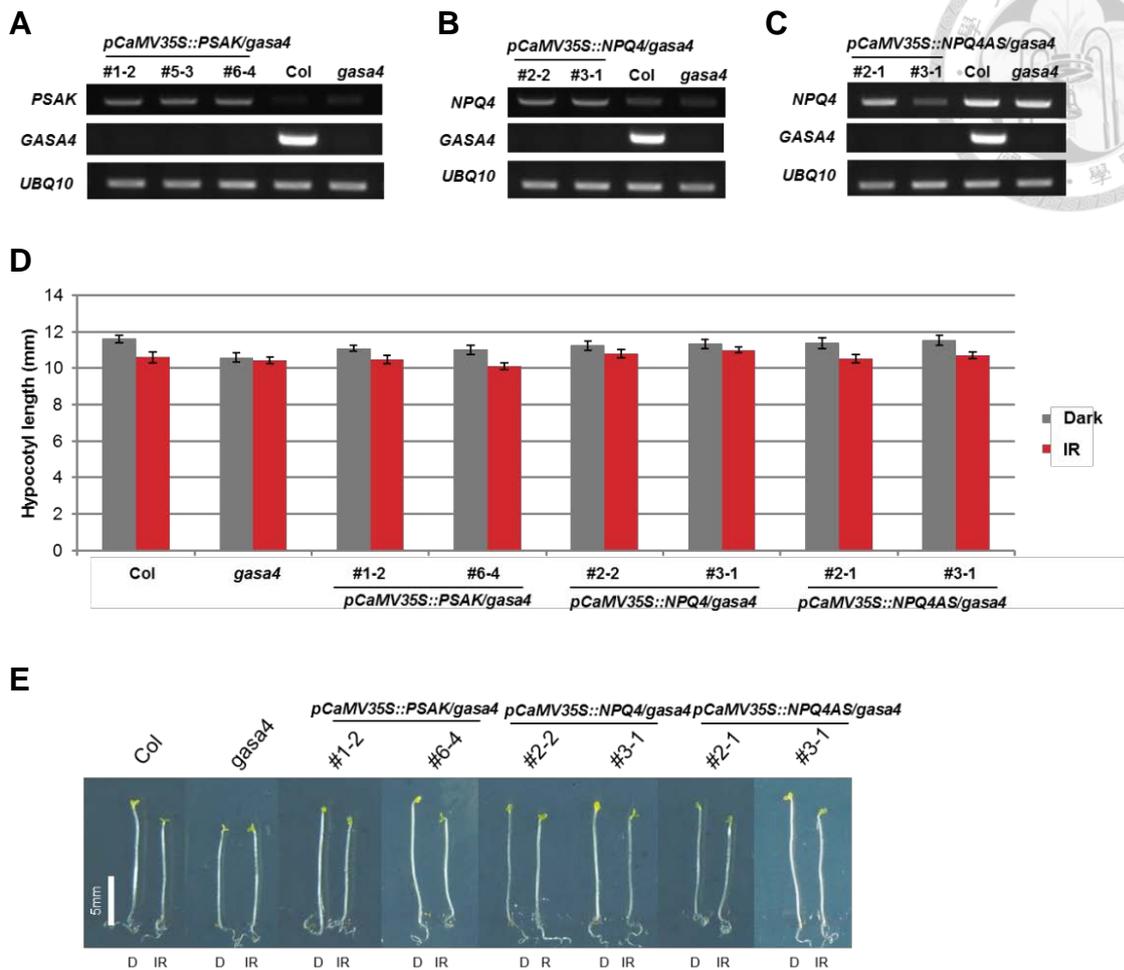


圖十二、GASA4 及 FIN219 參與在吉貝素及茉莉酸訊息傳遞交互作用的可能模式圖



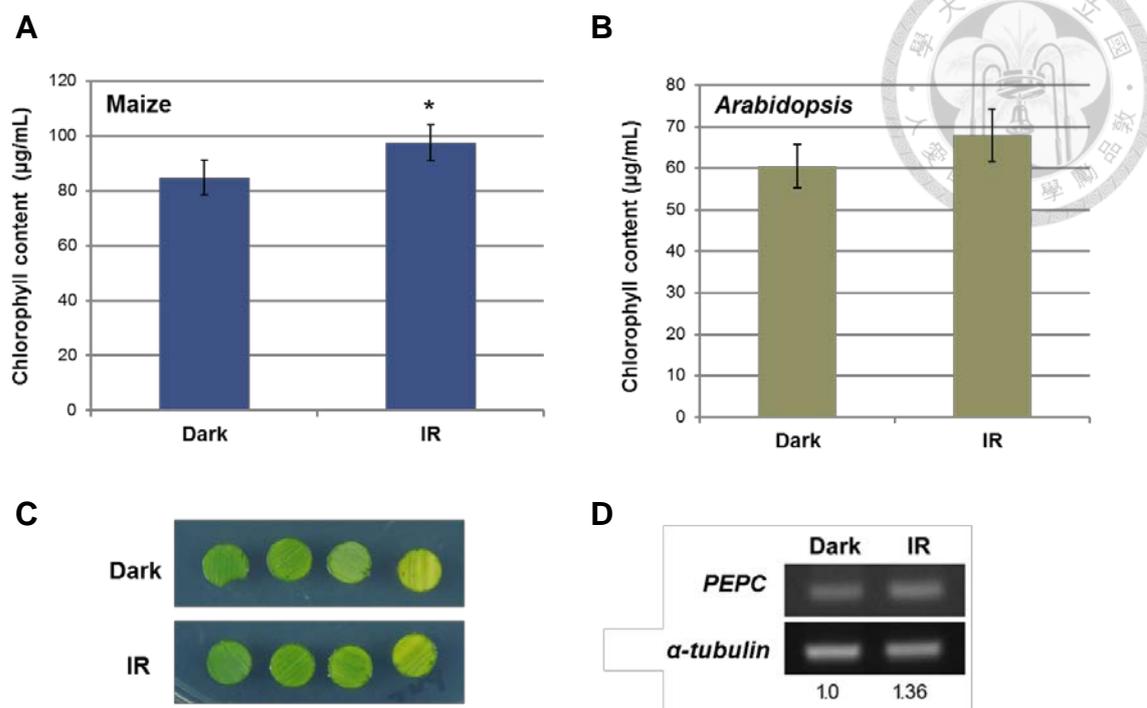
圖十三、*PSAK* 及 *NPQ4* 大量表現轉殖株在紅外光照射下呈現較長下胚軸的外表型

將 *PSAK* 及 *NPQ4* 轉殖株種植在 0.3% GM 培養基上，在黑暗及 3~5 μm 紅外光下生長四天後，測量各轉殖株之基因表現量及下胚軸長度。A 圖為檢測 *PSAK* 大量表現轉殖株中 *PSAK* 基因的表現量。B 圖為 *PSAK* 降低表現轉殖株中 *PSAK* 基因的表現量。C 圖為檢測 *NPQ4* 大量表現轉殖株中 *NPQ4* 基因的表現量。D 圖為 *NPQ4* 降低表現轉殖株中 *NPQ4* 基因的表現量。E、F 圖為 *PSAK* 轉殖株在黑暗及 3~5 μm 紅外光下生長的下胚軸長度統計及照片。G、H 圖為 *NPQ4* 轉殖株在黑暗及 3~5 μm 紅外光下生長的下胚軸長度統計及照片。實驗皆經過三重複 (n=30)。



圖十四、在 *gasa4* 突變株背景下的 *PSAK* 及 *NPQ4* 轉殖株會恢復成如同野生型的外表型

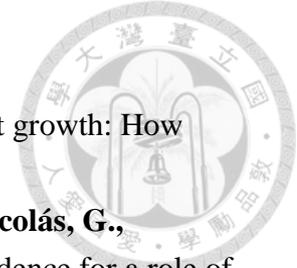
將在 *gasa4* 突變株背景下的 *PSAK* 及 *NPQ4* 轉殖株種植在 0.3% GM 培養基上，在黑暗及 3~5 μm 紅外光下生長四天後，測量各轉殖株之基因表現量及下胚軸長度。A 圖為檢測 *PSAK* 大量表現轉殖株中 *PSAK* 及 *GASA4* 基因的表現量。B 圖為檢測 *NPQ4* 大量表現轉殖株中 *NPQ4* 及 *GASA4* 基因的表現量。C 圖為 *NPQ4* 降低表現轉殖株中 *NPQ4* 及 *GASA4* 基因的表現量。D、E 圖為各轉殖株在黑暗及 3~5 μm 紅外光下生長的下胚軸長度統計及照片。實驗皆經過三重複(n=30)。



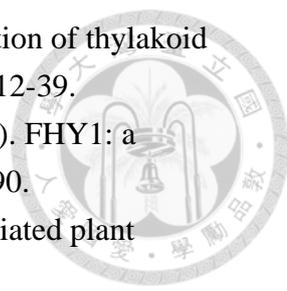
圖十五、紅外光能影響葉綠素的含量及促進 C4 植物 *PEPC* 基因的表現

將七天大的玉米幼苗或三周大的阿拉伯芥成株的葉片剪下，利用打洞機形成葉圓體(leaf disc)並平鋪在 0.3% GM 培養基上，經過黑暗或 3~5 μm 紅外光照射五天後，檢測葉綠素含量及 *PEPC* 基因表現。A 圖為玉米葉圓體經過黑暗或 3~5 μm 紅外光照射五天後的葉綠素含量。(*表示經 T-test 統計分析後有顯著差異者， $P \leq 0.05$) B 圖為阿拉伯芥葉圓體經過黑暗或 3~5 μm 紅外光照射五天後的葉綠素含量。C 圖為玉米葉圓體在黑暗或 3~5 μm 紅外光照射五天後的照片。D 圖為玉米葉圓體在黑暗或 3~5 μm 紅外光照射五天後，利用 RT-PCR 檢測 *PEPC* 基因表現量。 α -tubulin 作為 loading control。實驗皆經過兩重複(n=6)。

參考文獻



- Achard, P., and Genschik, P.** (2009). Releasing the brakes of plant growth: How GAs shutdown DELLA proteins. *J. Exp. Bot.* **60**: 1085-1092.
- Alonso-Ramírez, A., Rodríguez, D., Reyes, D., Jiménez, J.A., Nicolás, G., López-Climent, M., Gómez-Cadenas, A., Nicolás, C.** (2009). Evidence for a role of gibberellins in salicylic acid-modulated early plant responses to abiotic stress in *Arabidopsis* seeds. *Plant Physiol.* **150**: 1335-44.
- Aubert, D., Chevillard, M., Dorne, A.M., Arlaud, G., and Herzog, M.** (1998). Expression patterns of *GASA* genes in *Arabidopsis thaliana*: the *GASA4* gene is up-regulated by gibberellins in meristematic regions. *Plant Mol. Biol.* **36**: 871-883.
- Block, A., Schmelz, E., Jones, J.B., and Klee, H.J.** (2005). Coronatine and salicylic acid: the battle between *Arabidopsis* and *Pseudomonas* for phytohormone control. *Mol. Plant Pathol.* **6**: 79-83.
- Chaerle, L., Van Der Straeten, D.** (2000). Imaging techniques and the early detection of plant stress. *Trends in Plant Sci.* **5**: 495-501.
- Chen, I.C., Lee, S.C., Pan, S.M., and Hsieh, H.L.** (2007a). *GASA4*, a GA-stimulated gene, participates in light signaling in *Arabidopsis*. *Plant Sci.* **172**: 1062-1071.
- Chen, I.C., Huang, I.C., Liu, M.J., Wang, Z.G., Chung, S.S., and Hsieh, H.L.** (2007b). Glutathione S-transferase interacting with far-red insensitive 219 is involved in phytochrome A-mediated signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **143**: 1189-1202.
- Cheng, H., Qin, L., Lee, S., Fu, X., Richards, D.E., Cao, D., Luo, D., Harberd, N.P., Peng, J.** (2004). Gibberellin regulates *Arabidopsis* floral development via suppression of DELLA protein function. *Development* **131**: 1055-1064.
- Chini, A., Fonseca, S., Fernandez, G., Adie, B., Chico, J.M., Lorenzo, O., Garcia-Casado, G., Lopez-Vidriero, I., Lozano, F.M., Ponce, M.R., Micol, J.L., and Solano, R.** (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* **448**: 666-671.
- Chitnis, P.R.** (2001). PHOTOSYSTEM I: Function and Physiology. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**: 593-626.
- Chollet, R., Vidal, J., and O'Leary, M.H.** (1996) PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYLASE: a ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 273-298.
- 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.

- 
- Dekker, J.P., and Boekema, E.J.** (2005). Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim. Biophys. Acta.* **1706**: 12-39.
- Desnos, T., Puente, P., Whitelam, G.C., and Harberd, N.P.** (2001). FHY1: a phytochrome A-specific signal transducer. *Genes Dev.* **15**: 2980-2990.
- Devoto, A., and Turner, J.G.** (2003). Regulation of jasmonate-mediated plant responses in *Arabidopsis*. *Ann. Bot.* **92**: 329-337.
- Devoto, A., Nieto-Rostro, M., Xie, D., Ellis, C., Harmston, R., Patrick, E., Davis, J., Sherratt, L., Coleman, M., and Turner, J.G.** (2002). COI1 links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in *Arabidopsis*. *Plant J.* **32**: 457-466.
- Dill, A., and Sun, T.** (2001). Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **159**: 777-785.
- Fairchild, C.D., Schumaker, M.A., and Quail, P.H.** (2000). HFR1 encodes an atypical bHLH protein that acts in phytochrome A signal transduction. *Genes Dev.* **14**: 2377-2391.
- Fankhauser, C., and Chory, J.** (2000). RSF1, an *Arabidopsis* locus implicated in phytochrome A signaling. *Plant Physiol.* **124**: 39-45.
- Farmer, E.E., and Ryan, C.A.** (1990). Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 7713-7716.
- Feng, S., Martinez, C., Gusmaroli, G., Wang, Y., Zhou, J., Wang, F., Chen, L., Yu, L., Iglesias-Pedraz, J.M., Kircher, S., Schafer, E., Fu, X., Fan, L.M., and Deng, X.W.** (2008). Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature* **451**:475-479.
- Fonseca, S., Chini, A., Hamberg, M., Adie, B., Porzel, A., Kramell, R., Miersch, O., Wasternack, C., and Solano, R.** (2009). (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nat. Chem. Biol.* **5**: 344-350.
- Fu, X., and Harberd, N.P.** (2003). Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. *Nature* **421**: 740-743.
- Hoecker, U., Xu, Y., and Quail, P.H.** (1998). SPA1: a new genetic locus involved in phytochrome A-specific signal transduction. *Plant Cell* **10**: 19-33.
- Hoecker, U., Tepperman, J.M., and Quail, P.H.** (1999). SPA1, a WD-repeat protein specific to phytochrome A signal transduction. *Science* **284**: 496-499.
- Horton, P., Ruban, A.V., and Walters, R.G.** (1996). Regulation of Light Harvesting in Green Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 655-684.
- Hou, X., Lee, L.Y.C., Xia, K., Yan, Y., and Yu, H.** (2010). DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs. *Dev. Cell* **19**: 884-894.
- Hou, X., Hu, W.W., Shen, L., Lee, L.Y., Tao, Z., Han, J.H., and Yu, H.** (2008).

Global identification of DELLA target genes during *Arabidopsis* flower development. *Plant Physiol.* **147**: 1126-1142.

Hsieh, H.L., Okamoto, H., Wang, M., Ang, L.H., Matsui, M., Goodman, M., and Deng, X.W. (2000). FIN219, an auxin-regulated gene, defines a genetic link between phytochrome A and the downstream regulator COP1 in light control of *Arabidopsis* development. *Genes Dev.* **14**: 1958-1970.

Jensen, P.E., Gilpin, M., Knoetzel, J., and Scheller, H.V. (2000). The PSI-K subunit of photosystem I is involved in the interaction between light-harvesting complex I and the photosystem I reaction center core. *J. Biol. Chem.* **275**: 24701-24708.

Katsir, L., Schilmiller, A.L., Staswick, P.E., He, S.Y., and Howe, G.A. (2008). COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**: 7100-7105.

Kim, J., Yi, H., Choi, G., Shin, B., and Song, P.S. (2003). Functional characterization of phytochrome interacting factor 3 in phytochrome-mediated light signal transduction. *Plant Cell* **15**: 2399-2407.

Kim, Y.M., Woo, J.C., Song, P.S., and Soh, M.S. (2002). HFR1, a phytochrome A-signalling component, acts in a separate pathway from HY5, downstream of COP1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **30**: 711-719.

Kiss, A.Z., Ruban, A.V. and Horton, P. (2008). The PsbS protein controls the organisation of the photosystem II antenna in higher plant thylakoid membranes. *J. Biol. Chem.* **283**: 3972–3988.

Ko, C.B., Woo, Y.M., Lee, D.J., Lee, M.C., and Kim, C.S. (2007). Enhanced tolerance to heat stress in transgenic plants expressing the GASA4 gene. *Plant Physiol. Biochem.* **45**: 722-728.

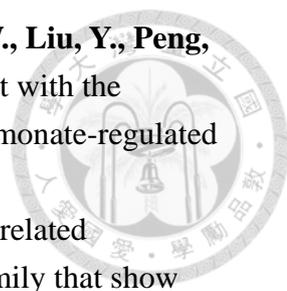
Krah, N.M., and Logan, B.A. (2010). Loss of psbS expression reduces vegetative growth, reproductive output, and light-limited, but not light-saturated, photosynthesis in *Arabidopsis thaliana* (*Brassicaceae*) grown in temperate light environments. *Am. J. Bot.* **97**: 644-649.

Lee, S., Cheng, H., King, K.E., Wang, W., He, Y., Hussain, A., Lo, J., Harberd, N.P., and Peng, J. (2002). Gibberellin regulates *Arabidopsis* seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Gene Dev.* **16**: 646-658.

Li, K.L., Bai, X., Li, Y., Cai, H., Ji, W., Tang, L.L., Wen, Y.D., and Zhu, Y.M. (2011). GsGASA1 mediated root growth inhibition in response to chronic cold stress is marked by the accumulation of DELLAs. *J. Plant Physiol.* **168**: 2153-2160.

Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., and He, S.Y. (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* **126**: 969-980.

- Nahirñak, V., Almasia, N.I., Hopp, H.E., and Vazquez-Rovere, C.** (2012). Snakin/GASA proteins: involvement in hormone crosstalk and redox homeostasis. *Plant Signal Behav.* **7**: 1004-1008.
- Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lison, P., Nemri, A., Harberd, N.P., and Jones, J.D.** (2008). DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Curr. Biol.* **18**: 650-655.
- Nishii, A., Takemura, M., Fujita, H., Shikata, M., Yokota, A., and Kohchi, T.** (2000). Characterization of a novel gene encoding a putative single zinc-finger protein, ZIM, expressed during the reproductive phase in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**: 1402-1409.
- Pauwels, L., Inze, D., and Goossens, A.** (2009). Jasmonate-inducible gene: What does it mean? *Trends Plant Sci.* **14**: 87-91.
- Porra, R.J., Thompson, W.A., and Kriedemann, P.E.** (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **975**: 384-394.
- Qi, T., Song, S., Ren, Q., Wu, D., Huang, H., Chen, Y., Fan, M., Peng, W., Ren, C., and Xie, D.** (2011). The Jasmonate-ZIM-domain proteins interact with the WD-Repeat/bHLH/MYB complexes to regulate Jasmonate-mediated anthocyanin accumulation and trichome initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **23**: 1795-1814.
- Quail, P. H.** (1997). The phytochromes: a biochemical mechanism of signaling in sight? *Bioassays* **19**: 571-579.
- Rubinovich, L., and Weiss, D.** (2010). The *Arabidopsis* cysteine-rich protein GASA4 promotes GA responses and exhibits redox activity in bacteria and in planta. *Plant J.* **64**: 1018-1027.
- Sakamoto, T., Miura, K., Itoh, H., Tatsumi, T., Ueguchi-Tanaka, M., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Agrawal, G.K., Takeda, S., Abe, K., Miyao, A., Hirochika, H., Kitano, H., Ashikari, M., and Matsuoka, M.** (2004). An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice. *Plant Physiol.* **134**: 1642-1653.
- Shi, L., Gast, R.T., Gopalraj, M., and Olszewski, N.E.** (1992). Characterization of a shoot-specific, GA3- and ABA-regulated gene from tomato. *Plant J.* **2**: 153-159.
- Smith, H.** (2000). Phytochromes and light signal perception by plants-an emerging synthesis. *Nature* **407**: 585-591.

- 
- Song, S., Qi, T., Huang, H., Ren, Q., Wu, D., Chang, C., Peng, W., Liu, Y., Peng, J., and Xie, D.** (2011). The Jasmonate-ZIM domain proteins interact with the R2R3-MYB transcription factors MYB21 and MYB24 to affect Jasmonate-regulated stamen development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **23**: 1000-1013.
- Staswick, P.E.** (2002). Jasmonate response locus JAR1 and several related *Arabidopsis* genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *Plant Cell* **14**: 1405-1415.
- Sullivan, J.A., and Deng, X.W.** (2003). From seed to seed: the role of photoreceptors in *Arabidopsis* development. *Dev. Biol.* **260**: 289-297.
- Szabo, I., Bergantino, E., and Giacometti, G.M.** (2005). Light and oxygenic photosynthesis: energy dissipation as a protection mechanism against photo-oxidation. *EMBO Rep.* **6**: 629-634.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He, S.Y., Howe, G.A., and Browse, J.** (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature* **448**: 661-665.
- Tseng, T.S., Swain, S.M., and Olszewski, N.E.** (2001). Ectopic expression of the tetratricopeptide repeat domain of SPINDLY causes defects in gibberellin response. *Plant Physiol.* **129**: 605-615.
- Wang, L., Wang, Z., Xu, Y., Joo, S.H., Kim, S.K., Xue, Z., Xu, Z., Wang, Z., and Chong, K.** (2009). OsGSR1 is involved in crosstalk between gibberellins and brassinosteroids in rice. *Plant J.* **57**: 498-510
- Wang, J.G., Chen, C.H., Chien, C.T. and Hsieh, H.L.** (2011). FAR-RED INSENSITIVE 219 modulates CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 activity via physical interaction to regulate hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **156**: 631-646.
- Wang, H., and Deng, X.W.** (2002). *Arabidopsis* FHY3 defines a key phytochrome A signaling component directly interacting with its homologous partner FAR1. *EMBO J.* **21**: 1339-1349.
- Wasternack, C.** (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann. Bot.* **100**: 681-697.
- Wild, M., Daviere, J.M., Cheminant, S., Regnault, T., Baumberger, N., Heintz, D., Baltz, R., Genschik, P., and Achard, P.** (2012). The *Arabidopsis* DELLA RGA-LIKE3 is a direct target of MYC2 and modulates jasmonate signaling responses. *Plant Cell* **24**: 3307-3319.
- Xu, L., Liu, F., Lechner, E., Genschik, P., Crosby, W.L., Ma, H., Peng, W., Huang, D., and Xie, D.** (2002). The SCF(COI1) ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**: 1919-1935.

- Yang, D.L., Yao, J., Mei, C.S., Tong, X.H., Zeng, L.J., Li, Q., Xiao, L.T., Sun, T.P., Li, J., Deng, X.W., Lee, C.M., Thomashow, M.F., Yang, Y., He, Z., and He, S.Y.** (2012). Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**: E1192-E1200.
- Yu, H., Ito, T., Zhao, Y., Peng, J., Kumar, P., and Meyerowitz, E.M.** (2004). Floral homeotic genes are targets of gibberellin signaling in flower development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 7827-7832.
- Zhang, S., and Wang, X.** (2008). Expression pattern of GASA, down-stream genes of DELLA, in *Arabidopsis*. *Chin. Sci. Bull.* **53**: 3839-3846.
- Zhang, S.C., Yang, C.W., Peng, J.Z., Sun, S.L., and Wang, X.** (2009). GASA5, a regulator of flowering time and stem growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **69**: 745-759.

附錄一:實驗詳細流程



1. RNA LiCl 萃取法:

藥品

Buffer A (1M Tris-Cl pH7.3 ; 5mM EDTA pH8.0 ; 1% SDS)

(滅菌 40 分鐘，4°C 保存)

Phenol pH 4.3

CI : Chloroform: Isoamyl alcohol (24:1, v/v)

6 M LiCl (滅菌 40 分鐘，常溫保存)

3 M LiCl (滅菌 40 分鐘，常溫保存)

2% KOAc (滅菌 40 分鐘，常溫保存)

100% 酒精 (-20°C 保存)

DEPC-H₂O (滅菌 40 分鐘)

步驟

1. 將植物材料置於 1.5ml 微量離心管中，加入液態氮冷凍後，用研磨棒磨成粉末。
2. 加入 500µl Buffer A，搖勻使植物材料完全溶於 Buffer A 中。
3. 加入 500µl Phenol，震盪 30 秒使之均勻後，以 4°C 13000 r.p.m 離心 20 分鐘，取上清液至新的離心管中。
4. 再次加入與上清液等體積的 Phenol，震盪 30 秒使之均勻後，以 4°C 13000 r.p.m 離心 20 分鐘，取上清液移至新的離心管。
5. 加入與上清液等體積的 CI，震盪 30 秒使之均勻後，以 4°C 13000 r.p.m 離心 20 分鐘，取上清液移至新的離心管。
6. 加入與上清液等體積的 6 M LiCl 混合均勻，置於-20°C 沉澱 over night。

7. 以 4°C 13000 r.p.m 離心 20 分鐘後，移除上清液。
8. 加入 150 μl 3 M LiCl 清洗沉澱物，以 4°C 13000 r.p.m 離心 5 分鐘。
9. 移除上清液，重覆步驟 8，並盡可能移除上清液。
10. 加入 150 μl 2% KOAc，於 55°C 下溶解沉澱物 15 分鐘(每 5 分鐘取出震盪 10 秒幫助溶解)。
11. 加入 2.5 倍體積的 100% 酒精，置於 4°C 30 分鐘使 RNA 沉澱。
12. 以 4°C 13000r.p.m 離心 15 分鐘後，盡可能倒掉上清液後，用真空乾燥機使 RNA 沉澱乾燥，加入 30μl DEPC-H₂O 回溶。



2. TURBO DNase 處理:

藥品

TURBO DNA-free kit (ABI cat #AM1907): TURBO DNase, 10X DNase buffer, inactivation buffer

DEPC-H₂O

配方

RNA(8μg)	X μl
10X DNase buffer	2.5 μl
TURBO DNase	0.5 μl
DEPC-H ₂ O	(22-X) μl
<hr/>	
Total	25 μl

步驟

1. 將上述混合均勻後，於 37°C 作用 30 分鐘。
2. 加入 3μl inactivation buffer，於室溫下作用 2 分鐘。
3. 4°C 13000rpm 離心 5 分鐘。
4. 將上清液移置新的微量離心管(注意不能吸到沉澱物)。



3. Reverse transcription:

藥品

RT-PCR kit (ABI cat.#4368814) : RTase, 100 mM dNTP, 10x RT buffer

RNAsin (Promega)

20 μ M Oligo-dT primer

DEPC-H₂O

配方

2X RT-mix:

DEPC-H ₂ O	3.7 μ l
10X RT buffer	2 μ l
Oligo-dT	2 μ l
100 mM dNTP	0.8 μ l
RTase	1 μ l
RNAsin	0.5 μ l
<hr/>	
Total	10 μ l
RNA(1-2 μ g)	X μ l
DEPC-H ₂ O	(10-X) μ l
<hr/>	
Total	10 μ l

步驟

1. 將上述配方混和均勻。
2. 以 PCR machine 設定處理(25°C 10 分鐘, 37°C 2 小時, 85°C 5 分鐘)
3. 加入 20 μ l 無菌水稀釋，保存於-20°C



附錄二:使用引子表列

Genotyping

引子名稱	引子序列 (5'→3')	Tm (°C)
LBb1.3	ATTTTGCCGATTCGGAAC	55
SALK_059774(fin219)_LP_F	CTACATTTTTGCTGCTCCGTC	59.9
SALK_059774(fin219)_RP_R	AAAAGCAGTGCGAACAGTTG	60.47
SALK_042431(gasa4)_RP_F	CCTTAAACCATGTGCAAACC	50.5
SALK_042431(gasa4)_LP_R	TGTGGGTCTCAAGATAGTGGG	54.4

Construction

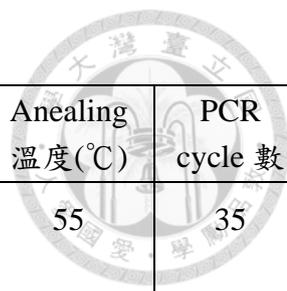
引子名稱	引子序列 (5'→3')	Tm (°C)
BamHI-PSAK-Fw	CAAGGATCCATGGCTAGCACTATG	57.4
BamHI-PSAK-Rv	CCAGGATCCTCAAATAGCACCAAT	55.7
NPQ4-BamHI-Fw	GGATCCATGGCTCAAACCATGCTGC	61.0
NPQ4-BamHI-Rv	GGATCCTTAGCTTTCTTCACCATCAT	56.4

RT-PCR (*Arabidopsis*)

基因名稱	引子序列 (5'→3')	Annealing 溫度(°C)	PCR cycle 數
UBQ10	GATCTTTGCCGAAAGAATTGGAGGATGGT CGACTTGTCATTAGAAAGAAAGAGATAACAGG	58	26
GASA4	CATCTCGAGATGGCTAAGTCATATGGAGCT CTACTCGAGTCAAGGGCATTGTTGGTCCACC	62	24
FIN219	GCAGTCGACATGTTGGAGAAGGTTGAACTTTC GGCGGATCCAAAACGCTGTGCTGAAGTAGCT	57	30

基因名稱	引子序列 (5'→3')	Anealing 溫度(°C)	PCR cycle 數
LOX2	TGCACGCCAAAGTCTTGTC GGCCACCAAGGTTTCGTCTTT	55	30
OPR3	CTTCTCCTTCTTCCAGATCGGC TTCGGGTACTTCACGTGGGA	55	30
AOS	TGGTTATCGAAAGCCACGAC AATCTCTCCGGCACAACCTC	53	28
MYC2	GATCTCCGGTGGTGTGCTC GACGGGTCGTTCTCACCTTG	53	28
VSP1	GCATCTCATACTCAAGCCAAACG GTGGTGCCAAAACGGCTACA	53	28
JAZ1	CACCCTCAAGCCGTACCAAG GCAAGGGGATTTAGACAGGCG	55	30
SPY	GATGGCCATAGCTCTGACAGAT CGCAGCAGAAAGGTTTGCAT	53	36
RGA	CTCTCCGATACTCTTCAGATG CAAGCCACCAGATTACAA	55	30
GAI	GTTGTGGCTTGTGATGGA GGATTTAGTTTGGCTTCG	55	30
RGL1	CCCGGATTCAAGAAAAGCCTGAC CAACAAACAACCTTCATTCTCTTCCAC	50	30
RGL2	CACGGCGGAGACGGACGT CCCGGTTTCAGGCGAGTC	52	36
RGL3	CCGGATTCATCCTTCCGC CTCGGTATCACAACACCA	50	30

RT-PCR (Maize)



基因名稱	引子序列 (5'→3')	Anealing 溫度(°C)	PCR cycle 數
PEPC1	AAGGACATCACTGACGACGAC CTGAAGGCTGCTTGGATCTC	55	35
α -TUBULIN	CACTGATGTTGCTGTCCTGC CGCTGTTGGTGATTTCGG	50	30