

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

山櫻花休眠胚軸受暖溫層積誘導之

*PcRACK1* 和 *PcPP2CA* 基因的選殖與分析

Cloning and characterization of *PcRACK1* and *PcPP2CA*  
genes induced during warm stratification in dormant embryo  
axis of *Prunus campanulata*

張堯雯

Yao-Wen Chang

指導教授：林讚標 博士

Advisor: Tsan-Piao Lin, Ph.D.

中華民國 101 年 7 月

July, 2012

## 致謝

有很多想說的，卻又不知從何說起，感恩許多人在這一路上向我伸出援手，讓我能順利通過這個考驗，往人生的下一階段邁進。

謹以此頁感謝所有曾幫助、陪伴我的人。



# 目錄

圖表目錄.....	III
附錄.....	IV
摘要.....	1
Abstract .....	2
<b>第一章 序論.....</b>	<b>3</b>
1.1 種子休眠.....	3
1.2 後熟作用與層積處理.....	5
1.3 山櫻花介紹.....	6
1.4 <i>RACK1</i> 的相關研究.....	7
1.5 <i>PP2C</i> 的相關研究.....	9
1.6 研究策略與目標.....	11
<b>第二章 材料與方法.....</b>	<b>12</b>
2.1 植物材料來源.....	12
2.2 暖溫層積處理(Warm stratification).....	12
2.3 山櫻花種胚之 Total RNA 萃取與電泳.....	12
2.4 反轉錄反應 (Reverse Transcription).....	13
2.5 3' RACE.....	13
2.6 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE).....	14
2.7 膠體萃取 DNA(Gel Extraction).....	17
2.8 接合反應(Ligation).....	18
2.9 勝任細胞轉型(Transformation).....	19
2.10 Colony PCR(藍白篩選).....	20
2.11 質體抽取(Plasmid DNA extraction).....	20
2.12 核酸定序.....	21
2.13 資料庫鑑定比對與基因樹製作.....	21
2.14 Real time PCR.....	21
2.15 LR reaction.....	22
2.16 阿拉伯芥花序浸染轉殖法(flower dipping).....	23
2.17 發芽率實驗.....	23
2.18 氣孔實驗.....	24
2.19 離體葉片失水速率實驗.....	24
2.20 鹽逆境實驗.....	24
2.21 葉部溫度測量.....	24
2.22 乾旱實驗.....	25
2.23 載體 pFAST-G02.....	25

第三章	結果.....	26
第四章	討論.....	32
圖表	.....	36
參考文獻	.....	55
附錄	.....	62



## 圖表目錄

圖一、以 RACE 釣取到的 <i>PcRACK1</i> 和 <i>PCPP2CA</i> 之 5'和 3'端片段.....	36
圖二、 <i>PcRACK1</i> 全長核苷酸序列與推演(deduce)的胺基酸序列.....	37
圖三、 <i>PcPP2CA</i> 全長核苷酸序列與推演(deduce)的胺基酸序列.....	39
圖四、 <i>PcRACK1</i> 和 <i>Arabidopsis</i> , 大豆(soy bean), 菜豆(snap bean), algae, 蓖麻子 (castor bean), 以及 tomato 的 RACK homologs 之胺基酸序列比對.....	41
圖五、 <i>PcPP2CA</i> 和菸草(tobacco), 蒺藜苜蓿(barrel medic), 歐洲山毛櫸(European beech), 番茄(tomato), 歐洲甜櫻桃(sweet cherry), 阿拉伯芥, 棉花(cotton), 以及玉米(corn)的 PP2C homologs 之胺基酸序列比對.....	42
圖六、 <i>PcRACK1</i> 蛋白質結構及基因樹(gene tree).....	43
圖七、 <i>PcRACK1</i> 和紫花苜蓿、菸草、阿拉伯芥和人類的 RACK homologs 之胺基 酸序列的 WD40 保守序列比對.....	44
圖八、 <i>PcPP2CA</i> 蛋白質結構及基因樹(gene tree).....	45
圖九、經 0, 1, 2, 3, 5, 7 天暖溫層積處理之山櫻花胚軸中 <i>PcRACK1</i> 和 <i>PCPP2CA</i> 的表現量變化.....	46
圖十、利用發光種子技術以螢光篩選 <i>PcRACK1</i> OE line 及 <i>PcPP2CA</i> OE line...	47
圖十一、轉基因阿拉伯芥之種子發芽率測定.....	48
圖十二、轉植株幼苗在高鹽逆境下之存活率測定.....	49
圖十三、 <i>PcRACK1</i> OE line 和 <i>PcPP2CA</i> OE line 在乾旱五天後葉部紅外線溫度影 像圖.....	50
圖十四、 <i>PcRACK1</i> OE line 和 <i>PcPP2CA</i> OE line 之離體葉片失水速率實驗.....	51
圖十五、 <i>PcRACK1</i> OE line 在 ABA 處理下氣孔孔徑變化測量實驗.....	52
圖十六、 <i>PcPP2CA</i> OE line 在 ABA 處理下氣孔孔徑變化測量實驗.....	53
圖十七、 <i>PcRACK1</i> OE line 和 <i>PcPP2CA</i> OE line 之乾旱耐受性實驗.....	54

## 附錄

附錄一、Seeds of Formosan cherry ( <i>Prunus campanulata</i> ) .....	62
附錄二、不同環境條件下 ABA 與 GA 調控種子休眠與發芽之模式圖.....	63
附錄三、低溫層積和暖低溫組合層積處理對山櫻花種子發芽率和平均發芽天數的影響.....	64
附錄四、暖溫層積對山櫻花種子含水量與平均重量的影響.....	65
附錄五、新鮮或層積處理後山櫻花種子內各部位的 ABA 含量.....	66
附錄六、新鮮或層積處理後山櫻花種子內各部位的 GAs 含量.....	67
附錄七、無處理與暖溫層積處理之山櫻花種胚的 ABA 含量.....	68
附錄八、 <i>PcRACK1</i> 和 <i>PcPP2CA</i> 為暖溫層積處理後山櫻花種胚中表現量提升的基因.....	69
附錄九、新鮮或暖溫層積之山櫻花種胚中 <i>RACK1B</i> 和 <i>PP2CA</i> 的相對表現量...	70
附錄十、阿拉伯芥 <i>RACK1</i> 之作用模式圖.....	71
附錄十一、PYR/RCAR-PP2C-SnRK2 之訊息傳導模式圖.....	72
附錄十二、植物氣孔圖解.....	73
附錄十三、引子列表.....	74
附錄十四、Vectors.....	75

## 摘要

潤濕種子置於特定溫度下以促進發芽的操作稱為層積。層積是打破種子休眠的常用方法，而層積又分為暖溫層積和冷溫層積兩種，冷溫層積廣泛應用於打破深層的種子休眠，而暖溫層積則通常與冷溫層積合併使用以促進發芽。相關研究顯示，冷溫層積可以增加種子內 GA 合成基因的表現，使種子內具生物活性 GAs 的含量提高，因而打破種子休眠。但目前對於暖溫層積的機制則尚不清楚。有研究報告指出山櫻花種子經過暖溫層積處理後，種子內的 ABA 含量會降低。

本實驗室先前的研究結果在暖溫層積後的山櫻花種胚中，找到兩個與阿拉伯芥中已知的 ABA 負調控基因 *AtRACK1B* 及 *AtPP2CA* 很相似的基因片段，本研究的目標是鈎取命名為 *PcRACK1* 和 *PcPP2CA* 的這兩個基因的全長序列，並製作過度表現 *PcRACK1* 或 *PcPP2CA* 之阿拉伯芥轉殖株，以了解它們在 ABA 訊息傳導以及暖溫層積對山櫻花種子造成的效用中所扮演的角色。

研究結果顯示 *PcPP2CA* OE line 的種子在添加 NaCl 或 ABA 的環境下皆較野生型具有更高的發芽率，但 *PcRACK1* OE line 的發芽率則低於野生型。在滲透壓逆境的測試中，*PcRACK1* OE line 和 *PcPP2CA* OE line 的存活率都明顯的高於野生型。在離體葉片失水速率實驗中，*PcRACK1* OE line 的失水率較野生型略低，而 *PcPP2CA* OE line 則較野生型高。紅外線攝影的結果顯示 *PcRACK1* OE line 的葉部溫度與野生型接近，而 *PcPP2CA* OE line 則低於野生型。乾旱逆境實驗中，*PcRACK1* OE line 植株與野生型的乾旱耐受能力相近，而 *PcPP2CA* OE line 的乾旱忍受度則明顯低於野生型。因此推測 *PcPP2CA* 為 ABA 的負調控者。基於上述結果，我們推論暖溫層積的作用機制是誘導 *PcPP2CA* 大量表現，以降低山櫻花種子對 ABA 的敏感度。

關鍵詞：山櫻花、*RACK1*、*PP2C*、離層酸、暖溫層積

## Abstract

Stratification is defined as imbibed seeds under specific temperature. There's two kinds of stratification: cold stratification and warm stratification. Cold stratification is widely used to break seed dormancy, while warm stratification combining with cold stratification is also used to break deep seed dormancy. From literatures it is known that cold stratification induces genes involved in bioactive gibberellins synthesis and promote germination. The mechanism to break dormancy by warm stratification, however, is not clear yet. Previous report indicated that seeds of *Prunus campanulata* after treatment of warm stratification would decrease ABA concentration.

Previous work in our lab found two gene fragments resembled *AtRACK1B* and *AtPP2CA*, which were known as negative regulators of ABA signaling in *Arabidopsis thaliana*. This study aims to obtain the full length of these two genes, named as *PcRACK1* and *PcPP2CA*, and to express them in *Arabidopsis thaliana* to study their roles played in warm stratification of *Prunus campanulata* seeds.

Seeds of *PcPP2CA* overexpression (OE) line had higher germination rate on medium containing NaCl or ABA than wild type plant, while the germination rate of *PcRACK1* OE line was lower than WT. The survival rate of *PcRACK1* OE line and *PcPP2CA* OE line on medium supplemented with salt were both higher than wild type plant. In experiments quantified the rate of water loss(RWL) of excised leaves, the result indicated that *PcRACK1* OE line had slightly lower RWL than WT, while *PcPP2CA* OE line had higher RWL than that of WT. Infrared image obtained by infrared thermometry showed that no marked difference in canopy temperatures between *PcRACK1* OE line and wild type plant, whereas canopy temperature of *PcPP2CA* OE line were significantly lower than wild type. *PcRACK1* OE line had slightly higher drought tolerance than wild type in the drought stress experiment, while *PcPP2CA* OE line had much lower drought tolerance. We suggest that *PcPP2CA* might be a negative regulator involved in ABA signaling transduction pathway. We inferred that the underlying mechanism of warm stratification of cherry seeds is to reduce the seed sensitivity to ABA.

Keywords: *Prunus campanulata* Maxim., *RACK1*, *PP2C*, ABA, warm stratification



# 第一章 序論

## 1.1 種子休眠

種子在環境中有充足水分與適合溫度的情況下仍不能發芽，便稱為休眠。休眠是一種重要的生理機制，植物藉由調控種子的休眠，避免種子過早發芽，例如在母株上萌發(viviparous)，並可確保幼苗能在適宜的環境下茁壯而不會遇上寒冷的冬季，藉而提高新生植株的存活率。

植物用以控制休眠與發芽的機制十分複雜，目前已知發芽抑制物質為離層酸(abscisic acid, ABA)，而促進發芽的物質為激勃素(Gibberellic Acid, GA)，這兩種植物荷爾蒙之間的拮抗結果，決定了休眠的種子是否要開始發芽。

### 1.1.1 種子休眠分類

種子休眠形式的分類有數種，Baskin and Baskin (2004)提出種子休眠分成五類：型態休眠(morphological dormancy, MD)、型態生理休眠(morphophysiological dormancy, MPD)、結構休眠(physical dormancy, PY)、生理休眠(physiological dormancy, PD)和組合休眠(combinational dormancy)。其中以生理休眠最為普遍 (Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006)。型態休眠是由於胚尚未發育完全所致。型態生理休眠是因為胚尚未成熟且胚生長潛力(embryo growth potential)不夠，胚生長潛力不足的原因可能是種子胚內的一些酵素、植物荷爾蒙、可溶性代謝物質，其濃度尚未足夠促使種子發芽，或者含有高量發芽抑制物或缺乏發芽促進物質。結構休眠指的是因為外殼的堅硬或防水，阻礙了種子的萌發。組合休眠為種子同時具有結構休眠和生理休眠。

種子休眠型式也可依抑制發芽因素所在的部位而分成胚休眠與種殼休眠兩類：胚休眠是指休眠因素來自胚部位，分成未成熟胚休眠、生理性胚休眠、化學性胚休眠三種。未成熟胚休眠是因為胚尚未發育完全，因此需要經過一段時間才能發芽，後熟作用或暖溫層積可以幫助這類休眠種子發芽。生理性胚休眠是指胚中發芽所需的物質不足，例如相關的蛋白質、酵素、植物荷爾蒙等，給予冷溫層積有助於打破休眠。化學性胚休眠指的是胚中有抑制發芽的化學物質存在，例如酚類或離層酸(ABA)，必須將之移除種子才會發芽。種殼休眠包含物理性種殼休眠、機械性種殼休眠、化學性種殼休眠三種。物理性種殼休眠指的是種殼緊實使種子即使在水分充足的環境中也無法吸水，從而導致不能發芽，此類種子經過後熟作用後，不吸水的情況可以改善。機械性種殼休眠是指種殼雖不防水，但十分堅硬而使種胚難以突破，因而限制了種子萌發，此類種子去除種殼或者將發芽孔磨薄可以促進發芽。化學性種殼休眠指的是種殼本身含有發芽抑制物質，或者阻礙了發芽抑制物質排出種子，或者含有酵素或化學物質可以消耗氧氣而造成胚缺氧，因此使種子不能發芽，去除種殼能有效幫助萌芽。上述之休眠型態可以同時出現一種以上，像是木本種子常見生理性胚休眠和未成熟性胚休眠共存(稱為複

合性休眠)。若是胚休眠與種殼休眠皆有者則稱為組合式休眠(台大農藝系網頁; Plant Physiology 5th Edition online)。

此外，休眠還能分成先天性休眠(*innate dormancy, inherent dormancy*)、誘導性休眠(*induced dormancy*)和強制性休眠(*imposed dormancy, enforced dormancy*) (Rao, 2000)。先天性休眠指種子成熟後有一段休眠時間，經過後熟作用後即可發芽。誘導性休眠又稱二次休眠，指種子無休眠或休眠結束後，因環境中具有不適宜發芽的因素導致種子再次進入休眠狀態，即使移除休眠誘導因素，種子仍會持續休眠，例如高溫導致芹菜(*Apium graveolens* L.)種子產生熱休眠(*thermodormancy*) (Pressman *et al.*, 1997)及缺乏光照導致刺萵苣(*Lactuca serriola* L.)種子產生暗休眠(*skotodormancy*) (Bewley, 1980)。強制性休眠則指種子受外界環境因素影響而被限制無法發芽，例如種子埋得太深而無法照光或氧氣不足，一旦抑制休眠因素被移除，種子就能開始發芽。

### 1.1.2 植物荷爾蒙與種子休眠

能抑制種子發芽而保持在休眠狀態的物質歸為發芽抑制物，而促進種子發芽打破休眠狀態的物質可稱為發芽促進物。

植物荷爾蒙中可歸類為促進物的有激勃素(*gibberellins, GAs*)、細胞分裂素(*cytokinins, CK*)及乙烯等。GAs 是最好的發芽促進劑，它能有效地拮抗 ABA 的休眠效果，並直接促使種子發芽(Groot and Karssen, 1987)。CK 則是具有與 ABA 拮抗的功能之外，還能增加種胚中 GAs 的含量。而乙烯具有類似於 CK 的效果，並且可以增加細胞對 GAs 的敏感度，從而提高 GAs 促進發芽的功效。另外，生長素(*auxin, indole-3-acetic acid, IAA*)可能也參與調控休眠，但目前尚未清楚其功用(Blake *et al.*, 2002)。

發芽抑制物包括 ABA、氨、氰化氨、生物鹼、不飽和內酯(*unsaturated lactone*)、不飽和酸 (*unsaturated acid*)、phenolic glucosides 等。已知最重要的發芽抑制物是離層酸(ABA)，ABA 是種子休眠的正調控者，它會誘導種子進入休眠，並使種子維持在休眠的狀態，ABA 的濃度越高種子通常越不容易發芽，濃度越低則越易發芽(Groot and Karssen, 1992; Koornneef *et al.*, 2002; Kucera *et al.*, 2005; Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006; Finkelstein *et al.*, 2008)，例如產生 ABA 8'-hydroxylases 的基因 *CYP707A2* 會在種子萌發初期被活化，使 ABA 被酵素分解而降低濃度，如果此基因失去功能，種子會表現出更深的休眠狀態(Okamoto *et al.*, 2006)。而阿拉伯芥對 ABA 不敏感的 *abil* 與 *abi3 mutant* 的種子休眠性則明顯降低(Koornneef *et al.*, 1984)。

種子內累積的 ABA 一部分是由植株其他部分合成，經由韌皮部輸送到種子(Hoad *et al.*, 1995)，另一部分則由種子自身合成(Karssen *et al.*, 1983a)。ABA 在種子發育時即逐漸累積，直到含量達到最高峰後停止增加，在種子的乾燥成熟期則開始減少(Hocher *et al.*, 1991; Paiva and Oliveira, 1995)。除了 ABA 的濃度外，ABA 訊息傳導路徑的相關基因對種子休眠都有重要的影響(Zeng *et al.*, 2003; Katagiri

*et al.*, 2005; Barrero *et al.*, 2010)。例如 *ABI4* 和 *AtLPP2*，*ABI4* 基因可轉譯出一種 AP2-type transcription factor，這個轉錄因子是 ABA 訊息傳導路徑中的正調控者，而 *AtLPP2* 是 *ABI4* 的上游負調控者。*AtLPP2* 基因的活化會導致種子在萌芽早期對於 ABA 的敏感度降低，因此使種子更易發芽(Finkelstein *et al.*, 1998)。

總結來說，種子中若缺乏 ABA 或對 ABA 不敏感則種子會有提早發芽的現象，過度表現 ABA 的合成基因或抑制其負調控基因則會使種子表現出更深的休眠或延遲發芽的情形。而 ABA 和活性 GAs 的比值決定了種子是否發芽(Karssen *et al.*, 1983b)。

### 1.1.3 環境因素與種子休眠

種子藉由感受外界環境因素決定是否發芽，而溫度和光是影響種子萌發與否最重要的環境因子。對於自然界中最普遍休眠型式—生理休眠來說，最好的打破休眠方法即是冷溫層積(濕潤冷藏)，這個方法在園藝學與森林學研究上沿用已久(Bewley and Black, 1994)，而暖溫層積和冷溫層積的組合可以有效打破櫻屬種子的休眠(Chien *et al.*, 2002)。照射紅光後活化的光敏素(phytochrome)可以增加種子內 *AtGA3ox1* 的表現量，使種子內的活性 GAs 增加而促進發芽(Yamauchi *et al.*, 2004)。

## 1.2 後熟作用與層積處理

後熟處理為將乾燥種子於室溫下放置一段時間，以打破休眠的方法。前人研究顯示種子經過後熟處理後，ABA 含量會稍微下降，對 ABA 的敏感度也會降低(Ali-Rachedi *et al.*, 2004)，學者認為後熟的功用在於：(1) 發芽時對環境溫度的要求降低；(2) 減少 ABA 含量或降低對 ABA 的敏感度，並且增加對 GA 的敏感度或者增加活性 GAs 的含量；(3) 減少需光照才發芽的種子對光照的需求；(4) 增加光照下也不發芽的種子對光的敏感性；(5) 使種子發芽不需外源硝酸鹽；(6) 加快發芽速率(Finch-Savage *et al.*, 2006)。綜上所述，後熟的作用在於使種子降低原本發芽所需的條件，使之更容易發芽。

層積處理指的是將浸潤種子置於低溫中以打破休眠的方法，常用溫度為 4 °C，又稱層積、冷溫層積或低溫層積。研究認為低溫層積可以增加催化活性 GAs 生成的酵素 *AtGA3ox1* 的表現量，因而使種子內的 GA 含量升高(Yamauchi *et al.*, 2004)，另外還可使種子對 GA 的敏感性提高。阿拉伯芥的 *gal* mutant 缺少合成 GAs 的重要酵素 *ent-kaurene synthase A* 而無法合成 GA，因此 *gal* 種子的發芽率很低，此性狀可藉由外加 GA 而被回復(Koornneef, *et al.*, 1980; Sun and Kamiya, 1994)。*gal* 種子置於 2 °C 黑暗中七天，與未經低溫處理之種子比較，僅需外加極少量之 GA4 即可發芽，可見冷溫層積處理能提高種子對於 GA 的敏感度，減少促使發芽所需的 GA 量(Yamauchi *et al.*, 2004)。GA3-oxidase 是合成具生物活性 GAs 的重要酵素之一，4 °C 層積可增加 *AtGA3ox1* 的表現量(Yamauchi *et al.*,

2004)，表示冷溫層積可能可以促進活性 GAs 的生合成。

暖溫層積又稱變溫層積，是將種子浸潤後置於較高溫的環境下一段時間以協助發芽的方法。常用溫度有：30/20 °C 和 25/15 °C。目前對於暖溫層積的效用尚不確定，可能是如後熟作用一般，使未成熟的胚有時間發育完全。

### 1.3 山櫻花介紹

山櫻花學名 *Prunus campanulata* Maxim.，薔薇科植物，生長於海拔五百至兩千公尺，是臺灣地區常見的觀賞樹種之一。山櫻花又稱緋寒櫻、山櫻桃，為落葉性中型喬木，樹高 3~10 公尺，樹皮深色而略帶金屬光澤，枝幹上有橫向開裂的皮孔。葉倒卵形至長橢圓形，互生。葉緣雙重鋸齒，葉柄基部有撕裂狀托葉。冬季落葉，之後先開花再長葉。花期為一到四月，花色桃紅至粉紅，花叢生或成繖狀花序，花梗細長，花朵自然下垂，花瓣 5 枚，著生於紅色鐘型萼筒上，具有多雄蕊與單一柱頭。核果肉質，成熟時為紅色至紫黑色，種核很大，外層具堅硬的內果皮，種皮為褐色。

#### 1.3.1 山櫻花種苗培育研究

山櫻花是極具觀賞價值之樹種，然而櫻屬的種子皆有休眠性，為了便於繁殖與栽培，探討如何有效打破休眠的研究是必要的。山櫻花的種子為深度休眠種子，其內果皮、種皮和胚含有 ABA，而以內果皮和種皮含量最高，若將種胚切下可在一周內發芽。山櫻花種子之堅硬內果皮阻礙了種子發芽，因此結構休眠亦是其種子休眠的主要因素之一(Chen *et al.*, 2007)，另外，對去殼但保留種皮之山櫻花種子施予 ABA 抑制劑 Fluridone 時，種子並沒有快速發芽，顯示山櫻花種子能持續製造 ABA 以維持休眠(Chen *et al.*, 2007)。 *Arabidopsis thaliana* ecotype Cvi (Ali-Rachedi *et al.*, 2004) 和 *Nicotiana plumbaginifolia* (Grappin *et al.*, 2000) 的種子也被證實能於種子浸潤期間製造 ABA。種子內自行生合成 ABA 的現象被認為是種子之所以能保持休眠狀態的機制。

前人研究顯示山櫻花種子若只以 5 °C 冷溫層積處理，經四個月以上發芽率才會達到 70%。而兩個月的 25/15 °C 暖溫層積再兩個月的 5 °C 冷溫層積之種子發芽率可達九成以上，顯示暖低溫組合層積處理可以有效的打破山櫻花種子的休眠。研究者認為這是因為新鮮採下的山櫻花種胚尚未完全成熟，施予暖溫層積處理可以達到後熟效用，而冷溫層積處理則能解除其生理休眠之故(Chien, 2004)。

另一份研究報告則指出，山櫻花種子經 4 周的 30/20 °C 暖溫層積處理，再經過 8 周的 4 °C 冷溫層積處理可達到最高的發芽率(98.7%)。暖溫層積期間山櫻花種子的 ABA 含量下降，而在冷溫層積期間除了可使種子 ABA 含量下降外，也促進具生物活性的 GA4 增加(Chien *et al.*, 2002)。

### 1.4 RACK1 的相關研究

### 1.4.1 起源

RACK1 (Receptor for Activated C Kinase 1) 最早於動物界中被發現，此蛋白因為可以與動物的 protein kinase C (PKC) 結合而得名 (Ron and Mochly-Rosen, 1994)。研究顯示，RACK1 存在於包括植物、動物、真菌等許多真核生物的細胞之中，而植物界中第一個被發現的 RACK1 蛋白是菸草 (*Nicotiana tabacum*) BY-2 細胞的 ArcA 蛋白，因其會被 auxin 誘導產生而被找到 (Ishida *et al.*, 1993)，之後其他的同源蛋白也從不同的植物中陸續被獲得，包括紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) (McKhann *et al.*, 1997)、阿拉伯芥 (Vahlkamp and Palme, 1997)、油菜 (*Brassica campestris*) (Kiyosue, 1999)、番茄 (*Lycopersicon esculentum*) (Kiyosue, 1999) 等。

植物的 RACK1 蛋白通常不只一種 (Guo *et al.*, 2007)，例如阿拉伯芥有三個同源的 RACK1 蛋白，分別命名為 RACK1A (*At1g18080*)、RACK1B (*At1g48630*) 和 RACK1C (*At3g18130*) (Chen *et al.*, 2006)；而水稻有兩個同源的 RACK1 蛋白，被命名為 RWD1 和 RWD2 (Iwasaki *et al.*, 1995)，確認功能後亦被稱為 RACK1A 和 RACK1B (Nakashima *et al.*, 2008)。

在原生生物以及所有的真核生物中都有找到 RACK1 的同源蛋白質，並且同源蛋白間的相似度都很高。比對植物和動物的 RACK1，可以發現在序列及結構上都具有很顯著的相似性，這顯示了 RACK1 在生物界中可能是相當保守的蛋白質。

### 1.4.2 RACK1 的結構

RACK1 是以 WD repeat (tryptophan-aspartate repeat) 為主要構成，此特殊結構又稱為 WD40 conserved domain。具有 WD40 conserved domain 的蛋白質通常是骨架蛋白，可以結合許多原本看似沒有互動而功能相關的蛋白質，而形成一個大型的多蛋白複合體，增進訊息傳遞鏈的特異性與效率。研究認為 WD40 蛋白質家族廣泛參與在各種細胞訊息傳遞系統中，扮演重要的統合與調節者角色。

RACK1 的結構與 G $\beta$  蛋白質非常相似，因此發現之初被認為是 G $\beta$  的同源蛋白，但在之後的研究中確定它的主要功能是做為骨架蛋白。其構型具有七個螺旋漿葉片，每個葉片由四個反向平行的  $\beta$ -sheet 組成，七個葉片圍繞著一個假想的中心軸，在蛋白質中間空出一個約 9 Å 的通道。RACK1 之特點，例如缺乏 G $\beta$  在 N 末端所具有的 44 個胺基酸長的螺旋鏈而無法和 G $\gamma$  結合，以及不和 G $\alpha$  產生直接互動等，顯示它與 G $\beta$  並非同一種蛋白質 (Adams *et al.*, 2011)。

RACK1 具有多個蛋白質結合位點，以阿拉伯芥最主要的 AtRACK1A 為例，其結構含有兩個保守性的蛋白質作用位點，分別位在螺旋漿構型之七個漿葉的上方和下方，使得 AtRACK1A 可以藉由這兩個位點和多種蛋白質結合 (Chen *et al.*, 2006; Adams *et al.*, 2011)。另外，RACK1 也能使與其結合的蛋白質變得穩定或者不穩定，例如 RACK1 可以穩定 PP2A 的活性。因此，植物 RACK1 蛋白質的主要功能便是作為骨架蛋白，並藉由結合不同組合的蛋白質以及對被結合蛋白質活性的影響，使得 RACK1 得以對特定的訊息傳遞路徑進行精確的調控。

### 1.4.3 RACK1 的生理功能

除了做為骨架蛋白之外，RACK1 還可藉由影響核糖體的組裝和活化來調控基因的轉錄。一般認為 RACK1 可以和活化的 PKC(protein kinase C)以及 40S ribosomal RNA 結合，然後活化的 PKC 磷酸化 60S ribosomal RNA 上的轉錄因子 eIF6，使 eIF6 脫離 60S ribosomal subunit，而促進了 40S 和 60S ribosomal subunit 結合成 80S 核糖體，因此使核糖體數量增加而使得蛋白質的生產量上升(Ceci *et al.*, 2003; Nilsson *et al.*, 2004)。相關研究顯示，阿拉伯芥的 RACK1A 可以與 40S ribosomal subunit 結合，也發現它可和 80S ribosome 一起移動，並證明 AtRACK1 能和 eIF6A、eIF6B 相互作用，這些研究表明 RACK1 可以藉由調控核糖體的組裝效率來調節細胞內蛋白質的生產量，並可能為 ABA 訊息傳導的相關基因 (Guo *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2011)。

文獻指出，RACK1 可能也與生長素(auxin)、油菜固醇(brassinosteroid, BR)、激勃素(gibberellin)等多種植物荷爾蒙之訊息傳遞路徑有重要關聯 (Chen *et al.*, 2006)，並認為它對於植株生長發育有重要的影響，而近來的研究則發現 RACK1 也參與了水稻抗病能力的誘導(Nakashima *et al.*, 2008)。

### 1.4.4 RACK1 與植物荷爾蒙

RACK1 蛋白參與了許多植物荷爾蒙的反應。生長素 Auxin 處理可以誘導菸草 BY-2 細胞中 RACK1 的產生，但其他荷爾蒙如 GA、ABA、cytokinin 等則沒有這樣的效果；而紫花苜蓿的 *RACK1* 可因 cytokinin 誘導增加表現量，但不受 auxin 影響。ABA 可以提升水稻浸潤種子中 *RACK1* 的表現量 (Komatsu *et al.*, 2005)，而水稻組織培養時，茉莉花酸、生長素和 ABA 的處理皆可誘導 RACK1 產生(Nakashima *et al.*, 2008)。阿拉伯芥的 RACK1 缺失株則表現出了對 auxin、ABA、gibberellin 以及 brassinolide 不敏感的表现型 (Chen *et al.*, 2006)，顯示植物之 RACK1 可能參與了一種以上的訊息傳遞路徑，並可能在植株的不同生長階段調節不同組織對不同植物荷爾蒙的反應。

然而儘管已知 RACK1 是多功用的調節者，它確切的反應機制仍有待研究。近年的研究發現 *RACK1* 於種子發芽及幼苗發育時期是 ABA 的負調控者 (Guo, 2009)，並認為 *RACK1* 不只抑制 ABA 造成的反應，也受到 ABA 的調控。

### 1.4.5 RACK1 與 ABA

目前對於 ABA 抑制種子萌發的解釋之一是 ABA 抑制了 RACK1 和 eIF6 相互作用而促進核糖體組裝的能力，使種子發芽所需的蛋白質產量不足因而延遲了幼苗的萌發。

相關的證據指出，對於阿拉伯芥的 *rack1a* 單突變株以及 *rack1a rack1b* 和 *rack1a rack1c* 雙突變株進行研究，外加的 ABA 會造成種子萌發、子葉綠化以及根系生長的抑制作用大幅增強；在無外加 ABA 的情況下，細胞內 ABA 的標誌基因 *RD29B* 和 *RAB18* 的表達量也比野生型相對提高。突變株除了離體葉片失水

速率明顯比野生型植株慢之外，研究並表示突變株種子萌發時對於鹽逆境較野生型更為敏感，顯示突變株對逆境的反應更為劇烈，亦即對 ABA 的敏感性上升。

外加 ABA 時，*AtRACK1A*、*AtRACK1B* 以及 *AtRACK1C* 的表現量都有減少的趨勢。*AtRACK1A* over-expression line 與野生型植株相比較，具有在外加 ABA 或 NaCl 時發芽率較高、外加 ABA 時根系生長較好與離體葉片失水速率較慢等表現型(Guo *et al.*, 2009b)。

## 1.5 PP2C 的相關研究

### 1.5.1 去磷酸酶簡介

蛋白質的磷酸化與去磷酸化是調節蛋白質活性的重要方法之一，也是細胞調節生理功能、傳遞訊息最常用的方式，因為控制蛋白質磷酸化與否的功能對細胞很重要，因此磷酸酶與去磷酸酶的胺基酸序列在生物界中呈現相當保守的型態，在原始與高等生物體內都可以發現近似的同源基因群。

去磷酸酶利用水解能力將目標基質上的磷酸根切除，達到蛋白質去磷酸化的效果。因為基質上連接磷酸根的胺基酸的不同，而可以分出兩個主要的大分類：Tyrosine -specific phosphatases 和 Serine/Threonine specific phosphatases。

真核生物的 Tyrosine-specific phosphatases 依對基質的專一性可分為 protein tyrosine phosphatases (PTPs)及 dual specificity PTPs (DSPTPs)兩類。而 Serine/Threonine specific phosphatases 則可由胺基酸序列及對二價陽離子的需求分成 phospho protein phosphatases (PPP)及 protein phosphatases ( $Mg^{2+}$ )magnesium- or ( $Mn^{2+}$ )manganese- dependent (PPM)兩個分類。

Serine/Threonine specific phosphatases 中的 PPP 可再分出 type 1 protein phosphatases (PP1)、type 2A protein phosphatases (PP2A)、type 2B protein phosphatases (PP2B) 等分類；而 PPM 則以 type 2C protein phosphatases (PP2C)為代表(Schweighofer and Meskiene, 2008)。

### 1.5.2 PP2C 簡介

PPM 家族的 PP2C 與同屬 Ser/Thr phosphatases 的 PPP 家族的蛋白質相比，雖然立體構型類似但胺基酸序列相似度低，且需要  $Mg^{2+}$  或  $Mn^{2+}$  才能發揮功能。此外 PP2C 並不受到 okadaic acid 抑制(okadaic acid 可抑制 PP1 及 PP2A 的活性)，而且以 monomer 存在，沒有 regulatory subunit 來調控它的活性、決定可催化的基質種類及酵素在細胞中的位置(Cohen *et al.*, 1898; Schweighofer *et al.*, 2004)。

PP2C 在真核細胞中的作用是受逆境誘導的 protein kinase cascades 的負調控者(Gaits *et al.*, 1997; Schweighofer and Meskiene, 2008)。動物的 PP2C 可分為  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  四種。和動物比起來，植物所擁有的 PP2C 數量明顯多了許多，模式植物阿拉伯芥的去磷酸酶家族中共有 76 個 PP2C (Kerk, *et al.*, 2002; Kerk, 2006)，可分成 A 到 J 十個小群與無法歸類的 6 個去磷酸酶(Schweighofer *et al.*, 2004)。PP2C

的催化區可存在蛋白質 N 端或 C 端，多數還具有 N 端或 C 端的延伸區域，一般認為這些多出來的片段對 PP2C 的酵素性質起了調控作用，然而也有少數的 PP2C 僅以催化單元構成，並不確定其調控功能(regulation)及基質選擇性(substrate specificity)是由何種方法控制(Schweighofer *et al.*, 2004)。

大多數與 ABA 訊息傳導有關的 PP2C 被歸類在 PP2C group A 中，例如著名的 ABI1、ABI2。這些去磷酸酶受 ABA 誘導產生，並通常做為 ABA 訊息的負調控者(Schweighofer and Meskiene, 2008)。

PP2C group B 則以苜蓿的 MP2C 為代表，MP2C 可以解除酵母菌中由費洛蒙引發之 mitogen - activated protein kinase (MAPK) pathway 而導致的生長停滯，在植物中則做為寒冷、乾旱、觸碰等壓力誘發之 stress-activated MAPK (SAMK) 訊息傳導路徑之負調控者(Meskiene, 1998)以及受傷誘發之 stress-induced MAPK (SIMK) 訊息傳導路徑之負調控者(Meskiene *et al.*, 2003)。MAPK interacting motifs 在其他生物中是於 PTPs 類去磷酸酶中發現，因此植物 PP2C 家族的 MP2C 及相關之 PP2C group B 蛋白質可能是趨同演化的結果(Schweighofer *et al.*, 2004)。阿拉伯芥中的同源蛋白是 AP2C1，缺失株 *ap2c1* 中受傷誘發的茉莉酸生成量增加，進而抑制植食性蠕類的侵襲，*AP2C1* 大量表現則會負調節乙烯生成而降低對真菌性壞疽病的免疫反應。*MP2C/AP2C1* 在成熟葉片中並不表現，只有植物受傷促使 stress-induced MAPK (SIMK) 系統活化而開始誘導相關基因表現時才大量產生，表示 *MP2C/AP2C1* 可能是 SIMK 訊息傳導的重要負調控者(Bogre *et al.*, 1997; Meskiene *et al.*, 2003)。

PP2C group C 中最具代表性的是 poltergeist phosphatase gene (POL) (Pogany *et al.*, 1998)，它是 CLAVATA (CLV) 訊息傳導路徑的下游基因，和平行同源基因(parallel, paralogous gene)一起調控 *WUS (WUSCHEL)* 的表現量，藉此控制分生組織的分化與器官的發育(Yu *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2006; Gagne *et al.*, 2007)。

### 1.5.3 PP2C Group A 簡介

PP2CA 的成員包括 *AHG1*、*AHG3/AtPP2CA*、*HAI1*、*HAI2*、*HAI3*、*ABI1*、*ABI2*、*HAB1* 和 *HAB2*(Schweighofer *et al.*, 2004)以及 *FsPP2C1*(Gonzalez-Garcia *et al.*, 2003)等，多數做為 ABA 訊息傳導路徑的負調控者並受到許多研究者重視。*ABI1* 和 *ABI2* 是 PP2C group A 中最早被找到的基因。ABA 可以促進 *ABI1*、*ABI2* 的轉譯，其表現水平約佔受 ABA 誘導產生之 PP2C 的一半。若此二基因有所缺陷，會導致突變株在外加 ABA 下發芽率較野生型高(Koornneef *et al.*, 1984)、根系發育較好以及氣孔關閉程度較小(Leung *et al.*, 1994; Meyer *et al.*, 1994)。

*HAI1(At5g59220)*、*HAI2(At1g07430)*、*HAI3(At2g29380)* 因其為 Highly ABA-Induced gene 而得名。有報導指出 *HAI1* 可與 SnRK2.2 互動(Fujita *et al.*, 2009)，*HAI1* 又名 *AtPP2CA2*，和 *AtPP2CA* 很相似，此基因受 ABA 誘導表現，在滲透壓逆境和 ABA 訊息傳遞中做為負調控者，但其在種子內並不表現，只有幼苗或成



株有表現(Antoni *et al.*, 2012)。

*HAB1* 即 *AtPP2C-HAB1* (homology to ABI1/ABI2)。其蛋白質 C 端與 ABI1 或 ABI2 皆有 60 % 以上的相似度(Rodriguez, 1998)，此基因在阿拉伯芥全株及果莢中皆有表現。*HAB1* 的過量表現會使種子和葉肉組織對 ABA 不敏感，而 T-DNA 插入突變株 *hab1-1* 之種子在外加 ABA 下發芽率較野生型低，但蒸散速率與野生型植株沒有差異(Saez *et al.*, 2004)。

*AtPP2CA /AHG3* 大量表現時，ABA 抑制種子發芽與導致氣孔關閉的效果降低。若此基因缺失，例如 *ahg3-1* 突變株，植株對 ABA 的敏感度則會上升(Kuhn *et al.*, 2006)。*AHG1* 和 *AtPP2CA/AHG3* 被認為是種子發育與成熟期間調控 ABA 路徑的關鍵基因(Kuhn, *et al.*, 2006; Yoshida *et al.*, 2006)，*AHG1* 與 *AtPP2CA* 不同的是，*AHG1* 只在種子中表達，突變株 *ahg1-1* 的成株並不出現和 ABA 有關的異常性狀(Nishimura *et al.*, 2007)。

## 1.6 研究策略與目標

本研究以休眠之山櫻花種子為材料，研究暖溫層積初期誘導表現的基因群中推測與負調控 ABA 訊息傳導路徑有關的 *PcRACK1* 和 *PcPP2CA* 的表現情形與可能功能。研究的目的是在於鈎取 *PcRACK1* 及 *PcPP2CA* 之全長 cDNA 序列，檢測它們在暖溫層積 0, 1, 2, 3, 5, 7 天的山櫻花種子中的表現情形，並將此二基因轉入阿拉伯芥以製成過度表現轉植株，藉由種子發芽實驗、失水率實驗、紅外線觀測與氣孔孔徑測量，以及乾旱實驗等方法，來探討它們是否參與 ABA 的訊息傳導，以進一步了解暖溫層積輔助打破山櫻花種子休眠之可能機制。

## 第二章 材料與方法

### 2.1 植物材料來源

4月底由阿里山一帶採集成熟之山櫻花(*Prunus campanulata*)果實，以流水洗除果肉，保留沈水種子，風乾三天後置於5℃冷藏室存放。

本研究使用去年採集之冷藏種子。

### 2.2 暖溫層積處理(Warm stratification)

乾淨種子與潮溼水苔(sphagnum)混和均勻後裝於夾鏈袋中，再放進避光袋內(以防止光活化phytochrome，而誘導GA合成)，置於30/20°C變溫生長箱中一段時間(0, 1, 2, 3, 5, 7天)。水苔濕度為400% (fresh weight basis)，即濕潤但不會滴水的程度(Chen *et al.*, 2007)。

層積處理完畢的種子除去水苔，洗淨後陰乾1~2小時，於乾燥箱中乾燥一天，置於-80℃冰箱冰存。

### 2.3 山櫻花種胚之 Total RNA 萃取與電泳

#### 2.3.1 Total RNA 萃取

1. 用老虎鉗剪開內果皮，撥開子葉後挑取胚軸，每項樣品收集50個胚。
2. 胚軸倒入研鉢，加入液態氮後小心磨碎。
3. 加入1 ml REzol™ C&T，磨勻後於室溫下靜置5~10分鐘。
4. 每1 ml REzol™ C&T加入0.2 ml chloroform，15秒快速震動，室溫放置10分鐘。
5. 於4℃下，13,000 rpm 離心15分鐘，取上清液0.5 ml，注意不可吸到中間層。
6. 將0.5 ml上清液置入新的離心管，加入同體積isopropanol混合均勻，室溫靜置10分鐘，然後4℃，13,000 rpm離心15分鐘。
7. 倒掉液體，留下白色沉澱物，加入1 ml 75%酒精，震盪清洗沉澱物。
8. 以4℃，13,000 rpm離心5分鐘。
9. 按步驟7、8再次以酒精清洗沉澱物，並離心。
10. 將酒精倒掉，等待殘餘酒精自然揮發。
11. 等沉澱物呈半透明時加入20~50 µl的DEPC水。
12. 放入-80℃冰箱保存。

#### 2.3.2 RNA 電泳

1. 使用 nano drop 測定 RNA 濃度後取 2~3 µg 的 RNA 或者直接取 2 µl

的 RNA 進行電泳。

2. 樣品 RNA 混入 2  $\mu$ l RNA loading dye 以及 1  $\mu$ l 稀釋 250X 的 EtBr。
3. 於 65  $^{\circ}$ C 加熱 5 分鐘後，放冰上 5 分鐘再跑膠。也可以直接跑膠。
4. 使用 1.2 % 不含 EtBr 的洋菜膠，電流 100V，條帶跑到約 1/2 處即可。

## 2.4 反轉錄反應 (Reverse Transcription)

使用 Applied Biosystems 出品之 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits。

1. 以 nano drop 測定 RNA 濃度，取 3  $\mu$ g RNA 加 DEPC 水補成 10  $\mu$ l 後，加入下列試劑：

10X buffer	2 $\mu$ l
T <sub>20</sub> (or Random primer)	1 $\mu$ l
Reverse Transcriptase	1 $\mu$ l
RNase inhibitor	0.5 $\mu$ l
dNTP	0.8 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	4.7 $\mu$ l
<hr/>	
Total volume	10 $\mu$ l

2. 震盪混勻，置於 PCR 機中，溫度設定：25  $^{\circ}$ C 10 分鐘，37  $^{\circ}$ C 2 小時，85  $^{\circ}$ C 5 分鐘。轉錄完成之 cDNA 置於 -20  $^{\circ}$ C 冰箱冰存。

## 2.5 3' RACE

使用 Invitrogen Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase Kit，使用 T<sub>20</sub> primer 及兩個 Gene specific forward primer (GSFP) 以山櫻花胚軸 cDNA 為模板進行 nested PCR。

1. First round PCR – touchdown PCR

cDNA	1 $\mu$ l	PCR 設定 (40 cycles)			
forward primer (GSFP1)	0.5 $\mu$ l	95 $^{\circ}$ C	5 min	95 $^{\circ}$ C	30 s
reverse primer (T <sub>20</sub> )	1.5 $\mu$ l	95 $^{\circ}$ C	30 s	55 $^{\circ}$ C	30 s
10x Taq buffer	2.5 $\mu$ l	76.5 $^{\circ}$ C	30 s	68 $^{\circ}$ C	1.5 min
Taq polymerase	0.3 $\mu$ l	(-1.5/per cycle, 20cycles)		68 $^{\circ}$ C	10 min
Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 $\mu$ l	68 $^{\circ}$ C	1.5 min	16 $^{\circ}$ C	$\infty$
dNTP (2.5 mM)	2 $\mu$ l				
ddH <sub>2</sub> O	16.2 $\mu$ l				
<hr/>					
Total volume	25 $\mu$ l				

2. Second round PCR

cDNA	1 $\mu$ l	PCR 設定 (30 cycles)	
forward primer (GSFP2)	0.5 $\mu$ l	95 $^{\circ}$ C	5 min
reverse primer (T <sub>20</sub> )	0.5 $\mu$ l	95 $^{\circ}$ C	30 s
10x Taq buffer	2 $\mu$ l	55 $^{\circ}$ C	30 s
Taq polymerase	0.3 $\mu$ l	68 $^{\circ}$ C	1.5 min
Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 $\mu$ l	68 $^{\circ}$ C	10 min
dNTP (2.5 mM)	1 $\mu$ l	16 $^{\circ}$ C	$\infty$
ddH <sub>2</sub> O	13.7 $\mu$ l		
Total volume	20 $\mu$ l		

## 2.6 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

本實驗採用 Invitrogen GeneRacer™ Kit (Invitrogen, Life technologies, Carlsbad, CA, USA)。

### A. Dephosphorylation Reaction :

以小牛腸鹼性磷酸酶 (calf intestinal phosphatase, CIP) 去磷酸化 non-mRNA or truncated mRNA (移除裸露的5'端磷酸根)

Total RNA	x $\mu$ l (3~5 $\mu$ g)
10X CIP Buffer	1 $\mu$ l
RNaseOut™ (40 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
CIP (10 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
DEPC water	y $\mu$ l
Total Volume	10 $\mu$ l

以上材料加好後輕柔混勻並短暫離心，置於50  $^{\circ}$ C 一小時(水浴槽或PCR機)，然後放冰上。

### B. Precipitating RNA :

1. 加入 90  $\mu$ l DEPC水和 100  $\mu$ l phenol:chloroform，震盪混勻 30秒。
2. 室溫高速離心13,000 rpm，5分鐘。
3. 上清液轉移到新的微量離心管。
4. 加入 2  $\mu$ l 10 mg/ml mussel glycogen, 10  $\mu$ l 3 M sodium acetate, pH 5.2 混合均勻。(此兩項試劑可以幫助RNA沉澱，並使微量的沉澱物更容易被看到。)
5. 加入 220  $\mu$ l 95 % ethanol，震盪混勻。
6. 置於-80  $^{\circ}$ C 冰箱，20分鐘後高速離心13,000 rpm，4  $^{\circ}$ C，20 min。
7. 去上清液，加入 500  $\mu$ l 70 % ethanol 輕彈幾下清洗沉澱物。
8. 高速離心13,000 rpm，4  $^{\circ}$ C，2 min，去上清液。
9. 室溫風乾，至沉澱物呈現半透明。
10. 加入7  $\mu$ l DEPC水回溶。

### C. Decapping mRNA Reaction :

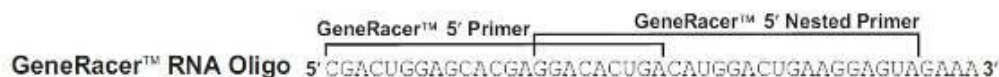
此步驟利用菸草酸性焦磷酸酶 (tobacco acid pyrophosphatase, TAP) 去除 mRNA 5' 端帽蓋，而暴露出磷酸根。

Dephosphorylated RNA	7 $\mu$ l
10X TAP Buffer	1 $\mu$ l
RNaseOut™ (40 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
TAP (0.5 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
<hr/>	
Total Volume	10 $\mu$ l

1. 以上材料和試劑輕柔混勻後短暫離心，置於37 °C 一小時，放冰上。
2. 然後再次進行RNA沉澱，步驟同B。

### D. Ligating the RNA Oligo to Decapped mRNA :

將GeneRacer™ RNA Oligo 結合上帶有磷酸根的mRNA 5' end。



1. 將7  $\mu$ l的dephosphorylated, decapped RNA樣品加入pre-aliquoted, lyophilized GeneRacer™ RNA Oligo (0.25  $\mu$ g)，溫和混勻後短暫離心。
2. 置於65 °C 下5 min (可消除二級結構，但可能損失1  $\mu$ l容積)。
3. 冰上2 min，短暫離心。
4. 再加入下列試劑：

10X Ligase Buffer	1 $\mu$ l
10 mM ATP	1 $\mu$ l
RNaseOut™ (40 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
T4 RNA ligase (5 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
<hr/>	
Total Volume	10 $\mu$ l

5. 置於37 °C 一小時，然後放冰上。
6. 再次進行RNA沉澱，步驟同B。

### E. 合成第一股cDNA

以SuperScript™ III RT kit逆轉錄mRNA，產生第一股cDNA後將RNA銷毀。

1. 材料添加如下：

ligated RNA	10 $\mu$ l
* primer	1 $\mu$ l
dNTP Mix	1 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	1 $\mu$ l
<hr/>	
Total volume	13 $\mu$ l

\* primer : GeneRacer™ Oligo dT Primer (60 bases), 序列如下 :



2. 65 °C 5分鐘後(可能損失1 µl, 剩12 µl), 放冰上至少一分鐘。
3. 再加入下列試劑 :

Step 1. mix	12 µl
5X First Strand Buffer	4 µl
0.1 M DTT	1 µl
RNaseOut™ (40 U/µl)	1 µl
SuperScript™ III RT (200 U/µl)	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	1 µl
Total volume	20 µl

4. 溫和混勻, 於50 °C反應一小時後, 再以70 °C處理15分鐘以終止反應。
5. 放冰上2分鐘, 再短暫高速離心。
6. 加入1 µl of RNase H (2 U), 37 °C下反應20分鐘。
7. 存放於 -20 °C 冰箱。

#### F. 製備RACE cDNA library

使用Invitrogen Platinum® Taq DNA Polymerase kit, 以及GeneRacer™ Kit 所附的GeneRacer 5' primer 及 Gene Racer 3' primer 以第一股cDNA做模板進行複製。

Template cDNA	5 µl
Gene Racer 5'- primer (10 µM)	3 µl
Gene Racer 3'- primer (10 µM)	3 µl
10× Taq DNA polymerase buffer	5 µl
Taq DNA polymerase	1 µl
2.5 mM dNTP	4 µl
50 mM MgSO <sub>4</sub>	2 µl
ddH <sub>2</sub> O	27 µl
Final volume	50µl

GeneRacer™ 5' Primer : 5'- CGACTGGAGCACGAGGACACTGA -3'

GeneRacer™ 5' Nested Primer : 5'- GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA -3'

GeneRacer™ 3' Primer : 5'- GCTGTCAACGATAACGCTACGTAACG -3'

GeneRacer™ 3' Nested Primer : 5'- CGCTACGTAACGGCATGACAGTG -3'

## G. 5' RACE

使用 Invitrogen Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase kit, 以及 GeneRacer<sup>™</sup> Kit 所附的 GeneRacer 5' primer 及 Gene Racer 5' nested primer 與自行設計的兩個基因專一性 reverse primers (GSRPs), 以 RACE cDNA library 做模板進行複製。

### 1. first round PCR

cDNA	0.5 $\mu$ l	PCR 設定(30 cycles)	
forward primer (GeneRacer 5' primer)	0.5 $\mu$ l	95 $^{\circ}$ C	5 min
reverse primer (GSRP1)	1.5 $\mu$ l	95 $^{\circ}$ C	30 s
10x Taq buffer	2.5 $\mu$ l	62 $^{\circ}$ C	30 s
Taq polymerase	0.25 $\mu$ l	68 $^{\circ}$ C	1 min
Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 $\mu$ l	68 $^{\circ}$ C	10 min
dNTP (2.5 mM)	2 $\mu$ l	16 $^{\circ}$ C	$\infty$
ddH <sub>2</sub> O	16.75 $\mu$ l		
<hr/>			
Total volume	25 $\mu$ l		

### 2. second round PCR

cDNA	1 $\mu$ l	PCR 設定(25 cycles)	
forward primer		95 $^{\circ}$ C	5 min
(GeneRacer 5' Nested primer)	0.5 $\mu$ l	95 $^{\circ}$ C	30 s
reverse primer (GSRP1)	0.5 $\mu$ l	62 $^{\circ}$ C	30 s
10x Taq buffer	2.5 $\mu$ l	68 $^{\circ}$ C	1 min
Taq polymerase	0.25 $\mu$ l	68 $^{\circ}$ C	10 min
Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 $\mu$ l	16 $^{\circ}$ C	$\infty$
dNTP (2.5 mM)	2 $\mu$ l		
ddH <sub>2</sub> O	17.25 $\mu$ l		
<hr/>			
Total volume	25 $\mu$ l		

## H. 3' RACE

使用 Invitrogen Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase Kit, 以及 GeneRacer<sup>™</sup> Kit 所附的 GeneRacer 3' primer 及 Gene Racer 3' nested primer 與自行設計的一個基因專一性 forward primer (GSRP), 以 RACE cDNA library 做模板進行複製。

除 primer 不同外, 試劑添加量與 PCR 設定同 5' RACE。

## 2.7 膠體萃取 DNA (Gel Extraction)

使用 Geneaid 之 Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit。

### A. Gel Dissociation

1. PCR 產物跑膠，在紫外燈下確認目標片段後，使用乾淨刀片切下片段。
2. 將最多 300 mg 之膠塊放入微量離心管，加入 500  $\mu$ l DF Buffer 混勻。
3. 將混合物置於 55~60  $^{\circ}$ C 乾浴 10~15 分鐘。乾浴期間每 2~3 分鐘搖晃一次。

### B. DNA Binding

1. 將 DF Column 置入 2 ml Collection Tube。
2. 將回復室溫之 800  $\mu$ l 試樣轉移到 DF Column，以 13,000 rpm 離心 30 秒。
3. 捨棄濾液，將 DF Column 放回 2 ml Collection Tube 中。
4. 若試樣多於 800  $\mu$ l，將剩餘的試樣轉移到 DF Column 再進行 DNA Binding。

### C. Wash

1. 加入 400  $\mu$ l W1 Buffer。以 13,000 rpm 離心 30 秒，捨棄濾液。
2. 加入 600  $\mu$ l Wash Buffer (ethanol added)，靜置 3~5 分鐘。
3. 以 13,000 rpm 離心 30 秒，捨棄濾液。再以 13,000 rpm 離心 5 分鐘，確保濾乾。

### D. DNA Elution

1. 將 DF Column 放入新的 1.5 ml 微量離心管。
2. 將 20  $\mu$ l Elution Buffer 小心沿 DF Column 管壁加入。靜置 2 分鐘。
3. 以 13,000 rpm 離心 5 分鐘。

## 2.8 接合反應 (Ligation)

5' 或 3' RACE 產物進行 T/A cloning，將片段送入質體，供之後送定序之用。

### 2.8.1 yT&A cloning

1. 混合下列試劑：

Ligation buffer A	1 $\mu$ l
Ligation buffer B	1 $\mu$ l
yT&A cloning vector	2 $\mu$ l
PCR product	2 $\mu$ l
T4 ligase	1 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	3 $\mu$ l
<hr/>	
Total volume	10 $\mu$ l

2. 室溫(或 22  $^{\circ}$ C)反應 1 小時。
3. 可再於 4  $^{\circ}$ C 反應 overnight (14~18 小時)，以增加成功率。
4. 進行轉型反應。

### 2.8.2 pGEM-T Easy



1. 混合下列試劑：

2X ligation buffer	5 $\mu$ l
pGEM-T Easy vector	1 $\mu$ l
PCR product	1.5 $\mu$ l
T4 ligase	1 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	1.5 $\mu$ l
<hr/>	
Total volume	10 $\mu$ l

2. 16 °C，overnight (14~18 小時)。或者 4 °C 反應兩天，效果更好。
3. 進行轉型反應。

### 2.8.3 pCR8/GW/TOPO TA Cloning

1. 混合下列試劑：

pCR8/TOPO vector (含 ligase)	0.25 $\mu$ l
PCR product	1.5 $\mu$ l
Salt solution	1 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	3.25 $\mu$ l
<hr/>	
Total volume	6 $\mu$ l

2. 室溫下反應 20 分鐘。
3. 進行轉型反應。

## 2.9 勝任細胞轉型(Transformation)

### 2.9.1 T/A cloning - DH5 $\alpha$

1. 含有 100 ppm Ampicillin 之 LB 培養皿先拿出回溫。
2. 取 2~3  $\mu$ l ligation product (yT&A、pGEM-T easy 或 pCR8/TOPO) 混入 50~100  $\mu$ l 的大腸桿菌勝任細胞 (DH5 $\alpha$ )。
3. 放冰上 20 分鐘，之後 42 °C 水浴 30 秒，再放冰上 20 分鐘。
4. 若非藍白篩，菌液直接塗盤，放 37 °C 生長箱 16~18 小時。
5. 若為藍白篩，則培養基均勻塗上 X-gal (50  $\mu$ l)+ IPTG(50  $\mu$ l)。
6. 然後將菌液塗上處理好的培養基，放 37 °C 生長箱 16~18 小時。

### 2.9.2 Entry cloning - Agrobacteria

1. 含有 100 ppm Spectinomycin 之 LB 培養皿先拿出回溫。
2. 取 1~5  $\mu$ l ligation product (pFAST-G02) 混入 200  $\mu$ l 的農桿菌勝任細胞 (農桿菌菌種 GV3101)。
3. 冰上 5 分鐘。

4. 放入液態氮中 5 分鐘。
5. 上防爆夾，37 °C 水浴 5 分鐘。
6. 以 LB 液態培養基補至 1 c.c.，28 °C 震盪培養 2~4 小時。
7. 低速離心(4,000 rpm)，5 分鐘。
8. 倒去上清液至剩 100  $\mu$ l，剩餘液體混勻使沉澱物重新懸浮後塗盤。
9. 於 28 °C 生長箱培養 2 天。

## 2.10 Colony PCR (藍白篩選)

1. colony PCR master mix :

forward primer	0.5 $\mu$ l
reverse primer	0.5 $\mu$ l
2X Pre-Mix	6 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	5 $\mu$ l
Final volume	12 $\mu$ l

2. 將 PCR mix 分裝到 PCR tube 中 (每管 12  $\mu$ l)。
3. 用滅菌過的牙籤挑起白色菌落，在含有 100 ppm Ampicillin 之 LB plate 上輕劃一筆，再伸進 PCR mix 混一下。
4. Plate 倒著放在 37 °C 培養箱培養過夜，之後以石蠟膜封好後放 4 °C 冷藏。
5. 沾好菌之 PCR tube，震盪混勻後短暫離心。
6. PCR 設定：(25 cycles)
 

95 °C	3 min
95 °C	30 s
58 °C	30 s
72 °C	1 min
72 °C	10 min
10 °C	$\infty$
7. 以 1~1.2 % agarose 膠，120~160 V 電壓，跑膠約 20~25 分鐘。

## 2.11 質體抽取(Plasmid DNA extraction)

使用 Geneaid 之 High Speed Plasmid Purification Kit。

1. 將兩管各 5 ml 的轉型大腸桿菌培養液以 4,500 rpm 離心 10 分鐘。
2. 去上清液，加入 200  $\mu$ l PD1 Buffer (RNase A added)，混勻重新懸浮細菌後移入微量離心管中。
3. 加入 200  $\mu$ l PD2 Buffer，輕柔搖勻(不可震盪，以免 genomic DNA 斷裂)，室溫靜置五分鐘。

4. 加入 300  $\mu$ l PD3 Buffer，輕柔搖勻後，冰於-20  $^{\circ}$ C 10 分鐘以幫助沉澱。
5. 13,000 rpm 離心 10 分鐘。
6. 上清液移入 PD Column (裝於 2 ml Collection Tube)，spin down 30 秒，棄濾液。
7. 加入 400  $\mu$ l W1 Buffer，spin down 30 秒，棄濾液。
8. 加入 600  $\mu$ l Wash Buffer (ethanol added)，靜置 5 分鐘後，spin down 30 秒，棄濾液。再以 13,000 rpm 離心 10 分鐘。
9. 將 PD Column 放入新的 1.5 ml 微量離心管。
10. 將 30  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O 小心沿 PD Column 管壁加入後，室溫靜置 10 分鐘。
11. 13,000 rpm 離心 5 分鐘。

## 2.12 核酸定序

1. 將目標菌落沾進裝有 1 ml 含 100 ppm Ampicillin 之 LB 液態培養基的微量離心管裡。
2. 將裝有菌液之微量離心管交由明欣生物科技公司代為定序。

## 2.13 資料庫鑑定比對與基因樹製作

1. 將定序完成之片段序列整理完成全長序列後，使用 NCBI 的 blastx program 進行比對，找出結構近似的基因群，並確認目標基因可能的功能。  
(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
2. 使用 MEGA5，以目標基因與相似基因做基因樹圖。

## 2.14 Real time PCR

以REzol<sup>TM</sup> C&T試劑萃取total RNA後，用Superscript III Reverse transcriptase kit (Invitrogen)合成cDNA。

於網站Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>)設計引子(Appendix 12)，使用KAPA SYBR Fast Bio-Rad icycler qPCR kit進行Real time PCR反應(Appendix 18)。

1. 於 Real time 專用管中混合以下試劑：  
(宜先製備 Master Mix，最後再一管一管加 cDNA)

2X SYBR Mix	10 $\mu$ l
Forward primer	0.2 $\mu$ l
Reverse primer	0.2 $\mu$ l
cDNA	1 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	8.6 $\mu$ l
<b>Total volume</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>

2. 使用型號：BIO-RAD MyiQ™ 的 thermocycler 進行 Real time PCR 反應。  
Real time PCR protocol 設定：
  - a. 95 °C 反應 3 min。
  - b. 再進行 40 cycles：95 °C, 10 s，60 °C, 30 s，72 °C, 30 s。
  - c. 95 °C 反應 1 min。
  - d. 55 °C 反應 1 min。
  - e. 55 °C 反應 10 s。
3. 數據以 iQ5 Optical System Software (BIO-RAD) 進行分析，並以推測為山櫻花種子 house-keeping gene 的 actin gene 為 Reference gene。

## 2.15 LR reaction

將原本在 pCR8/TOPO vector 上的目標基因轉進 destination vector。

### 2.15.1 Enzyme digestion

1. 試劑如下：

Plasmid	20 µl
10x buffer	5 µl
10x BSA	5 µl
Restriction enzymes	4 µl
ddH <sub>2</sub> O	16 µl
<b>Total volume</b>	<b>50 µl</b>

2. 限制酶的總量不可超過總體積 1/10。
3. 試劑加完混勻後於 37 °C 反應一小時。

### 2.15.2

1. 以限制酶切完之材料跑 PCR，電壓 100 V。
2. 切下目標片段，進行 Gel Extraction。
3. LR 試劑如下：

Gel extraction product	5 µl
pFAST-G02 vector	1 µl
LR clonase II Mix	2 µl
<b>Total volume</b>	<b>8 µl</b>

4. 輕柔混勻後，25 °C 下處理 2 小時。
5. 加入 1 µl Proteinase K，37 °C 處理 10 分鐘。
6. 取 2 µl Mix 加 100 µl DH5α，放冰上 15 分鐘，42 °C 處理 90 秒，再放冰上 15 分鐘，然後塗盤，放 37 °C 生長箱培養。

## 2.16 阿拉伯芥花序浸染轉殖法(flower dipping)

1. 三~四周大阿拉伯芥由花柄基部剪去第一次花序，待其長出 4~5 個次生花序。次生花序長到約 10 公分左右，可以用來做花序浸染轉殖。
2. 將轉型成功之農桿菌置於 2 ml agrobacteria liquid culture (YEBS + 100 ppm spectinomycin) 中，於 28 °C 震盪隔夜培養。
3. 將 1 ml 菌液置於 100 ml YEBS (含 100 µl spectinomycin)，於 28 °C 震盪培養 overnight。
4. 測菌液 O.D.600 值，約在 0.8 左右的菌液適合用來做花序浸染轉殖。
5. 將即將用來 dipping 之植株剪去果莢以及盛開白花，只留下未開之花蕾。
6. 將菌液裝入 falcon tube 以 3,500 rpm 室溫離心 30 分鐘。
7. 去上清液，以 100 ml flower dipping buffer 重新懸浮。
8. 加入 0.05 % Silwet L-77 後應馬上進行 dipping。花序浸泡菌液的時間不可太長。
9. 花序浸染轉殖後之植物置於箱中避光保濕兩天，之後拿出移入生長室。

### YEBS 配方

Yeast extract	1 g
Beef extract	5 g
sucrose	5 g
bacto-peptone	5 g
magnesium sulfate	0.5 g

1 L, pH 7

### Flower dipping buffer 配方

MS salt	0.215 g
sucrose	5 g
silwet L-77	50 µl

100 ml, pH 5.7 (KOH)

## 2.17 發芽率實驗

1. 將足量種子裝入微量離心管，無菌操作下加入 1 ml 洗種子用漂白水 (10 % bleach + 1 % tween 20)，震盪清洗 20 分鐘。
2. 無菌操作下，將種子以高溫滅菌過之蒸餾去離子水(ddH<sub>2</sub>O)清洗五遍。
3. 使用 1/2MS、0.7 % Agar 培養基。在培養皿背面畫好分隔線，做好標記。
4. 按標記將各類種子一顆顆點上培養皿，每類各 30 顆。
5. 以 3M 透氣紙膠帶封皿，放生長室。

6. 第 3、4、5 天記錄發芽率，並於第五天拍照。

## 2.18 氣孔實驗

1. 阿拉伯芥長到 5 周大後，可以開始此實驗。
2. 將葉片下表皮撕下，泡在裝有 10 ml MES buffer 之六孔盤中，每個 line 各做四孔。
3. Light 處理將六孔盤直接置於生長室中照光，Dark 處理則將六孔盤以錫箔紙包住，放於生長室中。
4. 2.5 小時後於同一樣品之四孔中分別加入 0、5、50、100  $\mu\text{l}$  之 10 mM ABA solution (in 95 % ethanol)。
5. Light 處理與 Dark 處理皆直接置於生長室中照光 2.5 小時。
6. 之後將下表皮從溶液中撈起，壓製成玻片，在光學顯微鏡下觀察並拍照。
7. 使用 ImageJ 軟體計算氣孔孔徑寬度。

## 2.19 離體葉片失水速率實驗

1. 阿拉伯芥長到 5 周大後，可以開始此實驗。
2. 使用小秤量盤，每個 line 各五盤，再加一盤秤量用。事先準備好足夠的數量並標上記號。
3. 將固定數量之葉片剪下，盡量選大小類似的葉片以避免重量相差太多。以秤量用小盤秤過後記錄，並放入標有對應記號的盤上。
4. 所有小盤放在一個大型淺底托盤上，在實驗室環境中自然陰乾。
5. 每 20 分鐘秤量一遍並記錄時間及重量。

## 2.20 鹽逆境實驗

1. 使用 1/2MS、0.7 % Agar 和 150 mM NaCl、1/2MS、0.7 % Agar 的培養基。
2. 將發芽三天的幼苗，移到畫好分隔線之培養皿上，每類十株，以透氣膠帶封皿，放於生長室。
3. 七天後觀察結果，並拍照記錄。

## 2.21 葉部溫度測量

使用紅外線熱像測溫儀(Thermo Gear G120/G100, NEC Avio Infrared Technologies Co.,Ltd.)觀測正常供水以及缺水狀態下植株的葉部紅外線圖像，並拍照記錄。

## 2.22 乾旱實驗

1. 荷蘭土篩過後，以 1:1 比例混合根基旺。
2. 將無菌培養之三天大幼苗移入土盆中。
3. 植株培養至三周大，不再澆水並將底盆移開，開始進行乾旱處理。
4. 乾旱約 12~19 天左右之植株視情況回水。
5. 回水 5 天後拍照記錄。

## 2.23 載體 pFAST-G02

pFAST-G02 為 Shimada *et al.* (2010)使用 Gateway Technology (Invitrogen, <http://www.invitrogen.com>)與 destination vector pBGWFS7 (Plant System Biology, <http://www.psb.ugent.be>)為基礎創建之 pFAST-G 系列載體中的一種(附錄十四)。此系列載體之特色為帶有以 *OLE1* promoter 引導之 *OLE1-GFP*，OLE1 為阿拉伯芥種子油脂體(oil body)膜蛋白 Oleosins 中最多的一種，成功轉入 pFAST-G 系列載體的種子會表現出 OLE1-GFP 融合蛋白，使種子在螢光顯微鏡下呈現出綠色螢光。



## 第三章 結果

### 一、鈎取 *PcRACK1* 與 *PcPP2CA* 全長並以生物資訊方式調查其背景

前人研究顯示，暖溫層積處理之所以能促進種子發芽，可能是因為它降低了抑制種子發芽的 ABA 濃度或者減少種子對 ABA 的敏感度。而魯(2011)以抑制性扣減雜交技術找到山櫻花種子經暖溫層積處理後表現量有所變化的基因，經過比對，發現其中有兩個受暖溫層積誘導增加表現的基因，其胺基酸序列片段相似於阿拉伯芥的 *AtRACK1* 與 *AtPP2CA*，故推測此二基因與暖溫層積輔助山櫻花種子提高發芽率的功效有關。由已知 *PcRACK1* 與 *PcPP2CA* 的基因片段序列，利用 RACE 技術鈎取 *PcRACK1* 與 *PcPP2CA* cDNA 全長(圖一)。

*PcRACK1* 全長總計 1245 個鹼基對，CDS 計 984 bp，預測轉譯出之蛋白質由 327 個胺基酸組成(圖二)，分子量 36.25 kD，等電點 6.75，胺基酸序列比對之後最近似於 RACK 蛋白質(圖四)。以 Blastx (NCBI)分析得知其胺基酸序列主要由 WD40 conserved domain 組成，屬於 WD40 super family (圖六)，與文獻(Adams *et al.*, 2011)中列出的 RACK 之胺基酸序列進行比對後，找到 7 個 WD40 conserved domain (圖七)，確認為 RACK 蛋白質。與阿拉伯芥之 *AtRACK1A*、*AtRACK1B*、*AtRACK1C* 之胺基酸序列做基因樹圖，得知其最接近於 *AtRACK1A* (圖六)。

*PcPP2CA* 基因全長計 1574 個鹼基，CDS 計 1206 bp，預測轉譯出之蛋白質由 401 個胺基酸組成(圖三)，分子量 43.6 kD，等電點 6.30，胺基酸序列比對之後最近似於 PP2C 蛋白質(圖五)。分析其構造之中具有一個 PP2Cc (PP2C catalytic) conserved domain，屬於 PP2Cc superfamily。找到阿拉伯芥中相似基因 *AtHAI1*、*AtHAI2*、*AtHAI3*、*AtABI1*、*AtABI2*、*AtABI3*、*AtAHG1* 及 *AtPP2CA/AtAHG3* 及水青剛之 *FsPP2C1* 與 *FsPP2C2*，以上述基因之胺基酸序列繪製基因樹圖後，得知 *PcPP2CA* 最接近於 *AtPP2CA*(圖八)。

### 二、暖溫層積對在山櫻花種胚中 *PcRACK1* 與 *PcPP2CA* 的表現情形的影響



根據魯(2011)的研究結果，新鮮山櫻花種胚中的 *PcRACK1* 與 *PcPP2CA* 在暖溫層積後都有顯著提升，其中 *PcRACK1* 的表現量於暖溫層積兩天之胚軸高於未處理之胚軸，於層積七天則低於未處理之胚軸；而 *PcPP2CA* 的表現量於暖溫層積兩天之胚軸明顯高於未處理之胚軸，於層積七天亦高於未處理之胚軸但差異較小。檢測方法使用 Real time PCR 並採用山櫻花 26S rRNA 做為 reference gene。

為了確認暖溫層積誘導基因表現的效果，將冷藏一年之山櫻花種子進行 0, 1, 2, 3, 5, 7 天暖溫層積後，以 Real time PCR 檢測 *PcRACK1* 與 *PcPP2CA* 的表現量，並採用山櫻花 *actin* 為 reference gene。檢測結果 *PcRACK1* 的表現量在進行暖溫層積一天後升高，之後隨著層積處理時間加長而慢慢減少，處理七天後又升高。而 *PcPP2CA* 的表現量在暖溫層積處理開始前已高於山櫻花 *actin* 基因的表現量，暖溫層積處理一天後有些波動，之後降低，直到處理七天後才又開始回升(圖九)。結果顯示 *PcRACK1* 受到暖溫層積誘導，而 *PcPP2CA* 則有受暖溫層積抑制的現象。

### 三、製作大量表現轉殖株(Over-Expression line, OE line)

為了觀察基因功能是否與預測相符，因此根據 FAST 轉殖技術(Shimada *et al.*, 2010)製作過度表現轉殖株，首先將 *PcRACK1* 和 *PcPP2CA* 之全長 CDS 分別構築於 pFAST-G02 vector。建構完成之 vector 轉入農桿菌中，以花序浸染法轉殖阿拉伯芥，獲得以 CaMV 35S 啟動子大量表現目標基因的 T1 子代種子。第一代轉殖種子(T1)在螢光顯微鏡下進行挑選，成功送入 vector 之種子在螢光顯微鏡下會顯現綠色螢光。篩選具螢光的種子播種，長成成株後以 genomic DNA PCR 確認插入目標基因，並以 RT-PCR 確認目標基因有無大量表現，拔除沒有插入目標基因的植株，其餘的繼續栽培。收第二代轉殖種子(T2)，在螢光顯微鏡下確認是否具有很亮:亮:暗約 1:2:1 的比例，從有這樣比例的種子中選擇最亮的種子播種。第三代轉殖植株(T3)以 cDNA 做 PCR 檢驗以確認插入的基因是否大量表現，並檢查其種子是否皆均勻的發亮(圖十)。

#### 四、大量表現 *PcRACK1* 或 *PcPP2CA* 之轉植株種子在高濃度 NaCl 或不同濃度 ABA 處理下的發芽率

已知同源蛋白 *AtRACK1A* 與 *AtPP2CA* 為 ABA 訊息傳導路徑的負調控者，因此預期 *PcRACK1* 與 *PcPP2CA* 也是 ABA 的負調控者，減少種子對 ABA 之敏感度，因而促使種子更易萌芽。因為進行實驗當時尚未取得 T3 子代種子，故而使用 T2 代種子，並先在螢光顯微鏡下挑去不發光的 WT 種子，才將剩下的 T2 代種子取做實驗之用。將篩選過的大量表現 *PcRACK1* 或 *PcPP2CA* 的 T2 代種子消毒後經春化 3~5 天播皿，第 3、4、5 天觀察發芽率。

第三天 1/2MS 培養基上 WT 發芽率 93%，*PcRACK1* OE line 7 發芽率 95%，*PcRACK1* OE line 11 發芽率 100%，*PcPP2CA* OE line 17 發芽率 98%，*PcPP2CA* OE line 23 發芽率 100%。1.5  $\mu$ M ABA 的 1/2MS 培養基上 WT 發芽率 0%，*PcRACK1* OE line 7 發芽率 0%，*PcRACK1* OE line 11 發芽率 0%，*PcPP2CA* OE line 17 發芽率 98.8%，*PcPP2CA* OE line 23 發芽率 97.7%。3  $\mu$ M ABA 的 1/2MS 培養基上 WT 發芽率 0%，*PcRACK1* OE line 7 發芽率 0%，*PcRACK1* OE line 11 發芽率 0%，*PcPP2CA* OE line 17 發芽率 76.6%，*PcPP2CA* OE line 23 發芽率 64.4%。100 mM NaCl 的 1/2MS 培養基上 WT 發芽率 48.4%，*PcRACK1* OE line 7 發芽率 3.3%，*PcRACK1* OE line 11 發芽率 14.4%，*PcPP2CA* OE line 17 發芽率 97.7%，*PcPP2CA* OE line 23 發芽率 97.7%。200 mM NaCl 的 1/2MS 培養基上 WT 發芽率 0%，*PcRACK1* OE line 7 發芽率 0%，*PcRACK1* OE line 11 發芽率 0%，*PcPP2CA* OE line 17 發芽率 15.5%，*PcPP2CA* OE line 23 發芽率 26.6%。綜合上述結果，*PcRACK1* OE line 於第三天的發芽率低於野生型種子，而 *PcPP2CA* OE line 發芽率高於野生型。

第四天 1/2MS 培養基上 WT 發芽率 97%，*PcRACK1* OE line 7 發芽率 96%，*PcRACK1* OE line 11 發芽率 100%，*PcPP2CA* OE line 17 發芽率 98%，*PcPP2CA* OE line 23 發芽率 100%。1.5  $\mu$ M ABA 的 1/2MS 培養基上 WT 發芽率 16.6%，*PcRACK1* OE line 7 發芽率 0%，*PcRACK1* OE line 11 發芽率 4.4%，*PcPP2CA* OE

line 17 發芽率 100 %，*PcPP2CA* OE line 23 發芽率 100 %。3  $\mu$ M ABA 的 1/2MS 培養基上 WT 發芽率 1.1 %，*PcRACK1* OE line 7 發芽率 0 %，*PcRACK1* OE line 11 發芽率 0 %，*PcPP2CA* OE line 17 發芽率 97.7 %，*PcPP2CA* OE line 23 發芽率 94.4 %。100 mM NaCl 的 1/2MS 培養基上 WT 發芽率 82.4 %，*PcRACK1* OE line 7 發芽率 18.8 %，*PcRACK1* OE line 11 發芽率 38.8 %，*PcPP2CA* OE line 17 發芽率 98.8 %，*PcPP2CA* OE line 23 發芽率 100 %。200 mM NaCl 的 1/2MS 培養基上 WT 發芽率 2.2 %，*PcRACK1* OE line 7 發芽率 0 %，*PcRACK1* OE line 11 發芽率 1.1 %，*PcPP2CA* OE line 17 發芽率 76.6 %，*PcPP2CA* OE line 23 發芽率 80 %。*PcRACK1* OE line 於第四天的發芽率低於野生型種子，而 *PcPP2CA* OE line 發芽率高於野生型。

第五天 1/2MS 培養基上 WT 發芽率 98 %，*PcRACK1* OE line 7 發芽率 96 %，*PcRACK1* OE line 11 發芽率 100 %，*PcPP2CA* OE line 17 發芽率 98 %，*PcPP2CA* OE line 23 發芽率 100 %。1.5  $\mu$ M ABA 的 1/2MS 培養基上 WT 發芽率 74.4 %，*PcRACK1* OE line 7 發芽率 6.7 %，*PcRACK1* OE line 11 發芽率 14.4 %，*PcPP2CA* OE line 17 發芽率 100 %，*PcPP2CA* OE line 23 發芽率 100 %。3  $\mu$ M ABA 的 1/2MS 培養基上 WT 發芽率 30.3 %，*PcRACK1* OE line 7 發芽率 0 %，*PcRACK1* OE line 11 發芽率 3.3 %，*PcPP2CA* OE line 17 發芽率 100 %，*PcPP2CA* OE line 23 發芽率 98.8 %。100 mM NaCl 的 1/2MS 培養基上 WT 發芽率 93.4 %，*PcRACK1* OE line 7 發芽率 43.3 %，*PcRACK1* OE line 11 發芽率 68.8 %，*PcPP2CA* OE line 17 發芽率 100 %，*PcPP2CA* OE line 23 發芽率 100 %。200 mM NaCl 的 1/2MS 培養基上 WT 發芽率 12.2 %，*PcRACK1* OE line 7 發芽率 0 %，*PcRACK1* OE line 11 發芽率 2.2 %，*PcPP2CA* OE line 17 發芽率 96.6 %，*PcPP2CA* OE line 23 發芽率 95.5 %。*PcRACK1* OE line 於第五天的發芽率低於野生型種子，而 *PcPP2CA* OE line 發芽率高於野生型。

總結結果，在添加 1.5  $\mu$ M ABA、3  $\mu$ M ABA、100 mM NaCl 和 200 mM NaCl 的 1/2MS 培養基上，*PcPP2CA* overexpression line 17 和 23 的發芽率皆明顯高於

野生型(wild type, WT)，而 *PcRACK1* overexpression line 7 和 11 的發芽率則都低於 WT (圖十一)。

### 五、大量表現 *PcRACK1* 或 *PcPP2CA* 之轉殖株幼苗對高鹽逆境的反應

為了進一步了解 *PcRACK1* 以及 *PcPP2CA* 對於 ABA 訊息傳導路徑的可能功能，因此將三天大幼苗移植到含有 0 mM NaCl、1/2MS 及 150 mM NaCl、1/2MS 的培養基上，七天之後觀察幼株白化的情形(圖十二)。

*PcRACK1* 的實驗中，野生型、*PcRACK1* OE line 7 和 *PcRACK1* OE line 11 在 1/2MS 培養基上的存活率皆為 100 %。而在含有 150 mM NaCl、1/2MS 的培養基上，野生型的存活率為 23.3 %、*PcRACK1* OE line 7 的存活率為 80 %、*PcRACK1* OE line 11 的存活率為 86.6 %。結果顯示 *PcRACK1* OE line 在高鹽逆境下較野生型植株具有較高的存活率。

*PcPP2CA* 的實驗中，WT、*PcPP2CA* OE line 17 和 *PcPP2CA* OE line 23 在 1/2MS 培養基上的存活率皆為 100 %。而在含有 150 mM NaCl、1/2MS 的培養基上，WT 的存活率為 16.6 %、*PcPP2CA* OE line 17 的存活率為 80 %、*PcPP2CA* OE line 23 的存活率為 100 %。結果顯示，*PcPP2CA* OE line 在高鹽逆境下具有較高的存活率。

綜合上述結果，在阿拉伯芥中過度表現 *PcRACK1* 或 *PcPP2CA*，皆可以大幅提升植株對高鹽逆境的耐受力。

### 六、大量表現 *PcRACK1* 或 *PcPP2CA* 之轉殖株的離體葉片失水速率及 ABA 處理下的氣孔開閉程度比較

以紅外線熱影像儀器檢視葉部溫度，來觀測其蒸散率大小的實驗中，將三周大正常環境生長的植株以紅外線熱像儀拍照，之後移出底盆並停止澆水，於乾旱五天後再拍照一次。結果乾旱五天的植株之紅外線照片顯示 *PcRACK1* OE line 7 和 11 之葉部溫度與野生型並無差別，而 *PcPP2CA* OE line 17 和 23 之葉部溫度則

明顯低於野生型(圖十三)。結果顯示 *PcRACK1* OE line 植株的蒸散率與野生型無差異，而 *PcPP2CA* OE line 植株的蒸散率高於野生型，因此推測 *PcPP2CA* OE line 之氣孔受 ABA 影響而閉合的程度小於野生型，而 *PcRACK1* OE line 之氣孔受 ABA 影響而閉合的程度與野生型相近。

離體葉片失水速率試驗顯示 *PcRACK1* OE line 的失水率略低於野生型，而 *PcPP2CA* OE line 的失水率則高於野生型植株(圖十四)。

觀察氣孔開閉受 ABA 影響情形的實驗中，顯示在光處理下的 *PcRACK1* OE line 的氣孔孔徑寬度較野生型略小，顯示 ABA 促使氣孔關閉的效果對 *PcRACK1* OE line 略明顯，在暗處理下，*PcRACK1* OE line 的氣孔孔徑寬度與野生型則沒有差異(圖十五)。光處理下的 *PcPP2CA* OE line 之氣孔明顯大於野生型，但在暗處理下則無差異(圖十六)。

## 七、大量表現 *PcRACK1* 或 *PcPP2CA* 之轉植株對乾旱逆境的耐受性

*PcRACK1* 與 *PcPP2CA* 之轉植株在高鹽逆境下皆有較高的存活率。*PcPP2CA* 轉植株的蒸散率高於野生型，外加 ABA 時氣孔孔徑寬度大於野生型；*PcRACK1* 轉植株的蒸散率略低於野生型，在外加 ABA 時氣孔孔徑寬度與野生型則並無差異。為了進一步確認此二基因在 ABA 訊息傳導路徑所扮演之角色，因此接下來要檢測這兩個基因的過度表現轉植株對於缺水之乾旱逆境的耐受能力。

將三周大正常環境生長的植株移出底盆，停止澆水約 12~19 天後視植株枯萎情形予以回水。從回水 5~7 天後的植株生長情形，可以看出 *PcRACK1* OE line 的存活率略高於野生型，而 *PcPP2CA* OE line 的存活率則明顯小於野生型，顯示 *PcRACK1* OE line 的耐旱能力略高於野生型植株，而 *PcPP2CA* OE line 則比野生型更不耐乾旱(圖十七)。

## 第四章 討論

研究顯示冷溫層積能增加種子對 GA 的敏感度而促進發芽(Derkx and Karssen, 1993)，然而暖溫層積的作用目前仍尚不清楚。有研究顯示，櫻屬種子經暖溫層積處理後，種子中的 ABA 含量明顯下降(Chen et al., 2007)，暗示暖溫層積可能誘導了某些基因的表現，因此降低了原本抑制種子發芽的 ABA 含量，而提高種子的發芽率。

魯(2011)也指出暖溫層積處理初期胚軸中 ABA 含量並無顯著下降，隨著暖溫層積處理時間延伸，胚軸中 ABA 含量才有較明顯的降低(Appendix 7)，因此魯(2011)認為胚軸中發芽抑制物 ABA 隨著暖溫層積時間增加而逐漸減少的現象，是打破休眠的一個重要關鍵。其並找到暖溫層積處理後胚軸中 mRNA 表現量增加的兩個基因片段 *RACK1* 和 *PP2CA*，它們與阿拉伯芥已知的 ABA 負調控基因 *AtRACK1B* 及 *AtPP2CA* 核苷酸序列相似(Appendix 8)，因此魯(2011)推論暖溫層積除了能降低種子內 ABA 含量，還能藉由促進 *RACK1* 和 *PP2CA* 的大量表現，減少胚軸對 ABA 的敏感度，而暖溫層積即以此機制輔助調控種子的休眠。

以 Real time PCR 檢測 *PcRACK1* 及 *PcPP2CA* 在暖溫層積初期的表現模式，*PcRACK1* 在暖溫層積初期受誘導產生，而 *PcPP2CA* 卻有受到暖溫層積抑制的情形。*PcPP2CA* 的表現和魯(2011)的 Real time PCR 結果並不相同(Appendix 9)，推測可能是因為種子的新鮮度差異所造成。魯(2011)所用材料為當年度新鮮採擷之山櫻花種子，而本研究沿用去年採集以 5 °C 冷藏保存之種子，可能 *PcPP2CA* 在種子冷藏期間已經被大量誘導產生，故之後再進行暖溫層積處理時反而減少其 mRNA 的轉錄。

以 NCBI 的 Blastx 工具進行分析比對，得知 *PcRACK1* 近似於 *AtRACK1A*，而 *PcPP2CA* 接近於 *AtPP2CA/AHG3*。文獻指出 *AtRACK1A* 和 *AtPP2CA/AHG3* 皆為 ABA 負調控者，因此預期 *PcRACK1* 與 *PcPP2CA* 亦是 ABA 負調控者，並參與種子內 ABA 訊息傳導。過度表現轉殖株 *PcRACK1* overexpression line 7、11 以及

*PcPP2CA* overexpression line 17、23 與野生型在正常生理狀態下的外表型並無太大差異。

以高濃度 NaCl 或外加 ABA 的培養基測試發芽率時，*PcRACK1* OE line 7、11 的種子發芽率皆明顯低於野生型，顯示 *PcRACK1* OE line 的種子在萌芽時對 ABA 和高滲透壓逆境更為敏感。文獻指出，*AtRACK1A* overexpression line 的發芽率在外加 ABA 的培養基上較野生型植物高，而以不同 NaCl 濃度的培養基測試種子的萌發能力時，*AtRACK1A* overexpression line 的發芽率也高於野生型(Guo *et al.*, 2009)。*PcRACK1* 在萌芽時對 ABA 訊息傳導路徑的正調控效果，與 *AtRACK1A* overexpression line 的表現型相反，顯示在種子發芽的調節上，*PcRACK1* 並不做為 ABA 的負調控者。

測試幼苗對高鹽逆境耐受力的實驗中，*PcRACK1* OE line 幼苗在高濃度 NaCl 逆境中的存活率明顯高於野生型，這個結果顯示 *PcRACK1* 大量表現可以協助幼苗抵抗高滲透壓逆境下 ABA 造成的生長停滯與子葉白化。Chen *et al.* (2006)指出 *AtRACK1A* 缺失株 *rack1a* 在幼苗生長時期對 ABA 更加敏感，顯示 *AtRACK1A* 可能在幼苗中做為 ABA 負調控者，減少幼苗對逆境誘導之 ABA 的敏感度，而使幼苗正常生長。因此推論 *PcRACK1* 可能也在幼苗時期擔任 ABA 負調控者，於逆境下幫助幼苗越過 ABA 造成之生長阻礙。

紅外線熱像相片顯示，*PcRACK1* OE line 之葉部溫度較野生型略低，但無顯著差異，顯示 *PcRACK1* OE line 之蒸散率與野生型並無差異。離體葉片失水速率實驗顯示 *PcRACK1* OE line 之失水率皆略低於野生型，而 Guo *et al.*(2009)的報告指出 *AtRACK1A* OE line 切下地上部測量之失水率較野生型低，突變株 *rack1a-1* 則較野生型高，顯示 *AtRACK1A* 可在逆境下協助降低植株的蒸散率，但 *PcRACK1* 似乎沒有此功能。氣孔孔徑測量實驗顯示 *PcRACK1* OE line 的氣孔孔徑寬度在 ABA 處理下較野生型略小，但沒有明顯差異。Guo *et al.*(2011)的研究報告指出 *rack1a rack1b* 之氣孔在無外加 ABA 下的張開程度大於野生型，而在外加 ABA 下的張開程度只略微大於野生型。由上述文獻與結果可知 *AtRACK1A* 與 *PcRACK1*

在 ABA 調控氣孔開閉的機制上並不擔任重要角色。以乾旱實驗測試 *PcRACK1* 對於植株耐旱性的影響。實驗結果顯示，*PcRACK1* OE line 的存活率略高於野生型，但無明顯差異。綜合紅外線熱像、失水率和氣孔實驗之結果，推測 *PcRACK1* 可能並不直接參與在 ABA 調節氣孔關閉的訊息傳導路徑中，因此過度表現 *PcRACK1* 對於阿拉伯芥植株之蒸散率、氣孔開閉功能與乾旱耐受力無明顯影響。

*PcRACK1* 和 *AtRACK1* 的過度表現轉植株之表現特性並不相同，*PcRACK1* 的表現型有些屬於正調控 ABA 的功能，有些屬於負調控 ABA 的功能，有些則與野生型沒有差異。這表示 *PcRACK1* 和 *AtRACK1* 之蛋白質效用並不完全相同，推測山櫻花 *PcRACK1* 與阿拉伯芥 *AtRACK1* 之功能並不一致，*PcRACK1* 在暖溫層積之山櫻花種子中所扮演的角色為何，尚需要更多實驗來加以確認。

以高鹽或外加 ABA 的培養基測試發芽率時，*PcPP2CA* OE line 17、23 的種子發芽率皆明顯高於野生型植株，此項結果與 *AtPP2CA/AHG3* (Kuhn *et al.*, 2006)、*HAIL(At5g59220)* (Antoni *et al.*, 2011)、*AtP2C-HABI*(Saez *et al.*, 2004)和 *FsPP2C1* (Gonzalez-Garcia *et al.*, 2003)等 *PP2C* 過度表現轉植株表現型相似，顯示 *PcPP2CA* 也具有負調控 ABA 的功能，其轉植株之種子對 ABA 與滲透壓逆境較不敏感，因而有助於種子更容易發芽。

將 3 天大之幼苗移入 150 mM NaCl 的培養基，以測試 *PcPP2CA* OE line 幼苗對高鹽逆境的耐受能力。結果顯示，*PcPP2CA* OE line 17 和 23 的種子在�高鹽環境下皆較野生型有更高存活率，表示 *PcPP2CA* 不只能協助種子抵抗逆境而發芽，還可以於植株幼苗期產生功用，降低幼苗對 ABA 的敏感度，使幼苗在�高鹽逆境中能夠繼續生長。

紅外線熱像相片中顯示短期缺水情形下 *PcPP2CA* OE line 的植株溫度明顯低於野生型，表示 *PcPP2CA* OE line 之蒸散率在缺水逆境下比野生型高。氣孔孔徑測量實驗與離體葉片失水速率實驗中，*PcPP2CA* OE line 失水率皆高於野生型，而其氣孔在光處理條件下較野生型的孔徑寬度更寬，此項結果與 *AtPP2CA/AHG3*、*HAIL(At5g59220)*和 *AtP2C-HABI* 之過度表現株表現型相似，但 *FsPP2C1*



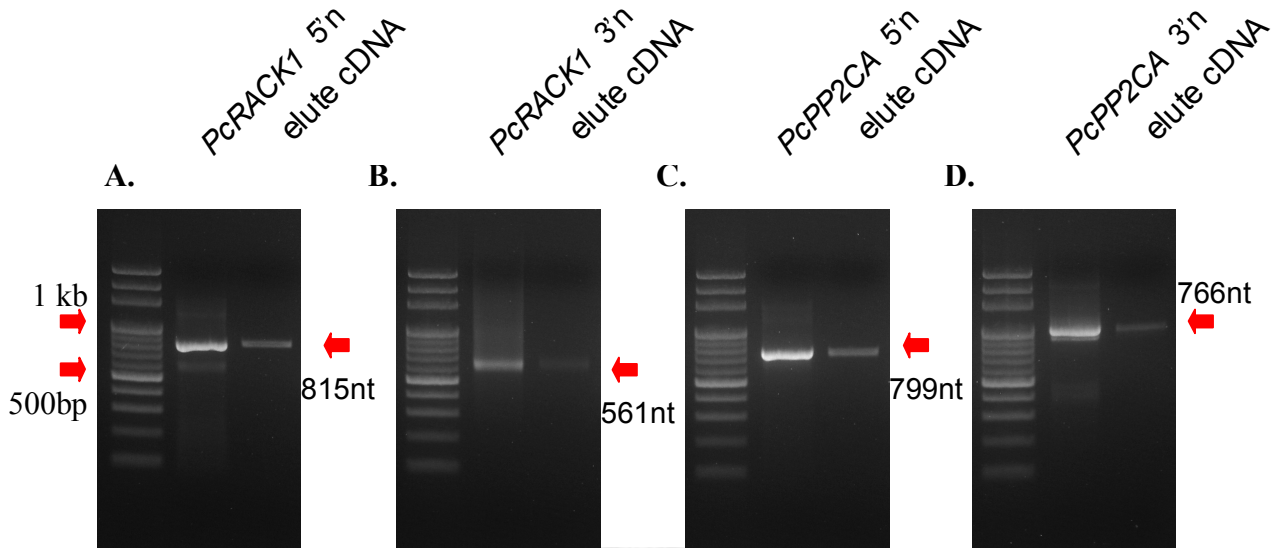
過度表現株之蒸散率則與野生型沒有差異。由此結果可知 *PcPP2CA* OE line 在外加 ABA 或輕微缺水逆境中氣孔並沒有明顯的關閉，推論 *PcPP2CA* 大量表現使氣孔對 ABA 的敏感度降低，由此可確認 *PcPP2CA* 為 ABA 訊息傳導之負調控者，且可能參與 ABA 調節氣孔大小的反應路徑，過度表現 *PcPP2CA* 會造成氣孔在外加 ABA 或輕微缺水環境下不易感受到逆境荷爾蒙 ABA 而持續張開，因而使 *PcPP2CA* OE line 的蒸散率在乾旱逆境中減少的幅度小於野生型植株。

以乾旱實驗測試 *PcPP2CA* 對於植株耐旱性的影響。結果顯示，*PcPP2CA* OE line 的植株存活率低於野生型，表示 *PcPP2CA* OE line 的乾旱耐受力低於野生型植株，推測此現象是因為 *PcPP2CA* OE line 的蒸散率在乾旱逆境下減少的幅度較野生型植株小，因此維持生存所需的水量比野生型高，較容易因為水分缺乏而死亡。另外，實驗中還觀察到 *PcPP2CA* OE line 比 *PcRACK1* OE line 更早出現葉片枯黃的情形，與 *PcPP2CA* OE line 同盆的野生型植株也比與 *PcRACK1* OE line 同盆的野生型植株更早出現缺水的性狀，推測是因為 *PcPP2CA* OE line 使土盆中的水分更快被消耗掉，而造成與 *PcPP2CA* OE line 種在同一盆的野生型植株缺水乾旱的速度快於與 *PcRACK1* OE line 同種一盆的野生型植株。

綜合上述實驗結果，可以確定 *PcPP2CA* 是一個相當典型的 ABA 負調控基因，因此推論受暖溫層積誘導產生之 *PcPP2CA* 可以降低山櫻花休眠胚軸對 ABA 的敏感度。

由 Chen *et al.*(2007)之報告結果得知，暖溫層積處理後山櫻花種子中的 ABA 含量明顯降低，而魯(2011)和本研究結果顯示，暖溫層積可以誘導 ABA 負調控者 *PcPP2CA* 的大量產生。綜合上述研究成果，我們認為暖溫層積對於山櫻花休眠種子的效用在於減少種子中的 ABA 含量，並藉由誘導 ABA 負調控者 *PcPP2CA* 的表現，降低胚軸對於 ABA 的敏感度。

## 第五章 圖表



圖一. 以 RACE 釣取到的 *PcRACK1* 和 *PcPP2CA* 之 5' 和 3' 端片段。

將符合預期之片段切膠 elute，獲得的片段轉進 vector 中，之後轉入勝任細胞，以 colony PCR 篩選菌落並送定序。A, *PcRACK1* 5' 端 nested PCR 產物(*PcRACK1* 5'n)，長度 815nt。B, *PcRACK1* 3' 端 nested PCR 產物(*PcRACK1* 3'n)，長度 561nt。C, *PcPP2CA* 5' 端 nested PCR 產物(*PcPP2CA* 5'n)，長度 799nt。D, *PcPP2CA* 3' 端 nested PCR 產物(*PcPP2CA* 3'n)，長度 766nt。

5' -ATTTTTTCTCTCAGCTTTCACTCTCACTCCGCGCCTTCGCTCTCGAAACCCTAGATACCCACTCA  
GCCGCCGAGCAAAGCCGAAGCC

ATG GCA GAA ACT CTC GTT CTC CGC GGA ACC ATG AGG GCT CAC ACC <045  
M A E T L V L R G T M R A H T  
GAC ATG GTC ACG GCC ATC GCC ATT CCG ATC GAC AAC TCT GAG ATG <090  
D M V T A I A I P I D N S E M  
ATC GTC TCG GCA TCG CGC GAC AAG TCT ATC ATC CTC TGG CAT CTT <135  
I V S A S R D K S I I L W H L  
ACC AAG GAT GAG AAG ACT TAC GGT GTG CCC CGC CGC AGG CTA ACC <180  
T K D E K T Y G V P R R R L T  
GGC CAC TCT CAC TTC GTC CAG GAC GTC GTC CTA TCA TCC GAC GGC <225  
G H S H F V Q D V V L S S D G  
CAG TTC GCG CTC TCT GGA TCC TGG GAC GGC GAG CTT CGC CTC TGG <270  
Q F A L S G S W D G E L R L W  
GAC TTG GCT CTC GGC GTC TCT GCT CGT CGC TTT GTG GGC CAC ACC <315  
D L A L G V S A R R F V G H T  
AAG GAC GTT CTC TCC GTA GCC TTC TCG ATT GAC AAC CGT CAG ATC <360  
K D V L S V A F S I D N R Q I  
GTT TCG GCC TCC CGC GAC CGT ACG ATC AAA CTG TGG AAC ACT CTT <405  
V S A S R D R T I K L W N T L  
GGT GAG TGC AAG TTC ACT ATC CAG GAC CAA GAC GGG CAT GGT GAT <450  
G E C K F T I Q D Q D G H G D  
TGG GTC AGC TGC GTC CGC TTC AGC CCC AAT ACA CTG CAG CCC ACC <495  
W V S C V R F S P N T L Q P T  
ATC GTA TCA GCC TCG TGG GAC AAG ACC GTC AAA GTG TGG AAC TTG <540  
I V S A S W D K T V K V W N L  
ACC AAC TGT AAG CTG AGG TGC ACC CTT GAA GGG CAC AAT GGT TAT <585  
T N C K L R C T L E G H N G Y  
GTG AAC ACA GTG GCG GTT TCT CCT GAT GGC TCA TTG TGC GCC AGC <630  
V N T V A V S P D G S L C A S  
GGA GGG AAA GAT GGA GTG ATT TTG CTG TGG GAT TTG GCA GAA GGC <675  
G G K D G V I L L W D L A E G  
AAG ATG CTT TAC TCA CTT GGT GCT GGT GCT ATT ATC CAC GCT CTC <720  
K M L Y S L G A G A I I H A L  
TGC TTC AGT CCC AAC AGG TAC TGG TTG TGC GCG GCA ACT GAA CAA <765  
C F S P N R Y W L C A A T E Q

```

AGC ATT AAG ATC TGG GAT TTG GAA AGC AAG CAA ATC GTT GAG GAT <810
S   I   K   I   W   D   L   E   S   K   Q   I   V   E   D
TTG AAG GTT GAT CTC AAA ACT GAG GCT GAG AAG ACA GAG GAT ACC <855
L   K   V   D   L   K   T   E   A   E   K   T   E   D   T
CAT GCT GCT ACT GCT TAC AAG AAG AAG GTT ATT TAC TGT ACA AGT <900
H   A   A   T   A   Y   K   K   K   V   I   Y   C   T   S
TTG AAC TGG AGT GCT GAT GGG AGC ACC TTG TTT AGC GGC TAC TCC <945
L   N   W   S   A   D   G   S   T   L   F   S   G   Y   S
GAT GGG GTA ATC AGA GTT TGG GGC ATT GGC CGT TAC TAG           <984
D   G   V   I   R   V   W   G   I   G   R   Y   *

```

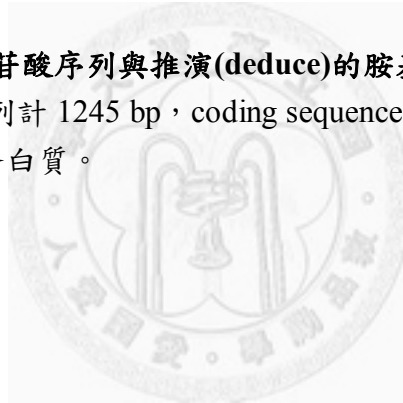
```

AAAAGCTTGGGAGTAATATTCTCCTCGGGACTTATGTTATCGAGAACAGCCCGTTACTTTTTTTTGTTCCTT
GTAGTTGCATTAAAGTTTATTTAGTTTTTGTGGAAATGTTGGACATGTTGGATTTTATCATTATGTTGA
CTATATGGCTTTGAGGCCTCGTTATTTTG-3'

```

**圖二. *PcRACK1* 全長核苷酸序列與推演(deduce)的胺基酸序列。**

*PcRACK1* 全長核苷酸序列計 1245 bp，coding sequence 計 984 bp，預期可轉譯成由 327 個胺基酸組成之蛋白質。



5' -CCCTTACATCTTCCTGTTTCAATTTAAATTAATAAAAAATTCATTTTATTTTCGCGCAAAAATGGGATTA  
ATTTAGATGAATTAACCTTTTGAA

ATG ACG GAG ATC TGC TGC GGA GTA GTG AGC GAG ACT GAC ACG TCA <045  
M T E I C C G V V S E T D T S  
TCG AAT CCG TGC GAG CAG AGC TCA CGT GCC GCA AGG CGG AGG AGG <090  
S N P C E Q S S R A A R R R R  
ATG GAG ATC CGA CGG TAC AAA TTC GTC TCC GGC GTG GCC TCA CCG <135  
M E I R R Y K F V S G V A S P  
CCA GAA AAT GCC GAG AAA CGC AAG AAA GTC GAG GCC TGC CCT ACG <180  
P E N A E K R K K V E A C P T  
TCG GTT TCT CGC GAC CTG GAC AAC GCC TTG GAG TGT TCC GGC ACT <225  
S V S R D L D N A L E C S G T  
TCC GAC GAA GAG AAA GTC GTT GCG AGC CTG AAG ATT TCG GCC CAG <270  
S D E E K V V A S L K I S A Q  
TGC CGG CCG TCC ACT TCA TCG AAC ATT CCA GAA GCC TCC AGT GAG <315  
C R P S T S S N I P E A S S E  
CTT CCG AAG TAC GGA TTG GCT TCC GTT TGT GGA AGA CGA CGA GAT <360  
L P K Y G L A S V C G R R R D  
ATG GAG GAC GCG GTG TCC ATA CAC CCA TCG TTT TGC GGA CGC AAC <405  
M E D A V S I H P S F C G R N  
CGA GAA ACC GTC GGG AAA TTG CAT TAC TTC GGC GTC TAC GAT GGC <450  
R E T V G K L H Y F G V Y D G  
CAT GGC TGC TCT CAT GTG GCG ACG AGA TGT AAA GAG CGG TTA CAT <495  
H G C S H V A T R C K E R L H  
GAG CTG GTG AGA GAC GAA CTG GAG AGC ATG GAG GAG TGG AGG ACC <540  
E L V R D E L E S M E E W R T  
GCC ATG AAG CGA AGC TTC GTG CGA ATG GAC AAG GAG GTG GTT GCG <585  
A M K R S F V R M D K E V V A  
TGG AGC GAA GGT GGC GGT GGA GTG AGT CAT TGC CGC TGC GAG CTT <630  
W S E G G G G V S H C R C E L  
CAA ACG CCC GAG TCC GAT GCC GTT GGA TCC ACG GCC GTC GTC GCT <675  
Q T P E S D A V G S T A V V A  
GTC GTC ACT CCC GAT AAG ATC GTT GTT GCT AAT TGT GGC GAT TCT <720  
V V T P D K I V V A N C G D S  
AGG GCC GTG CTC TGC CGA AAT GGC AAG GCT TTT CCT CTT TCA GTT <765  
R A V L C R N G K A F P L S V

```

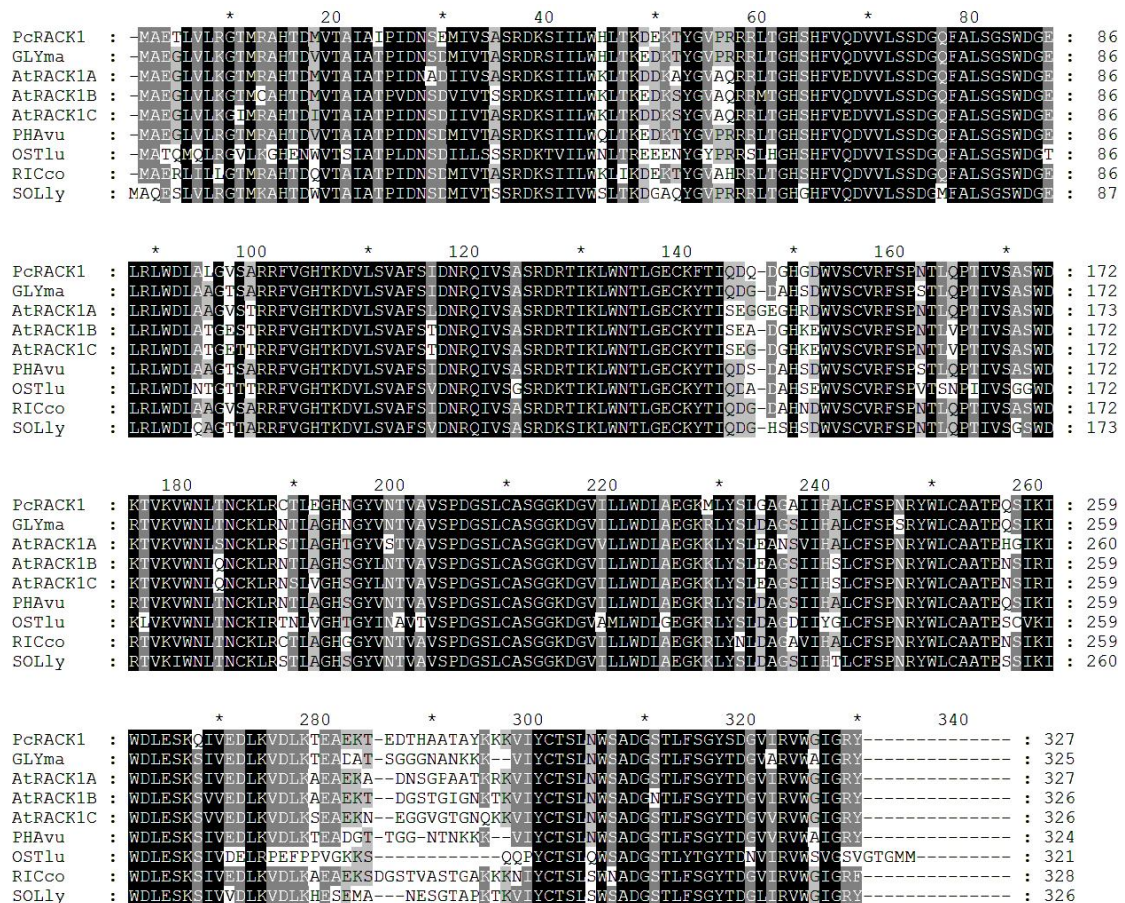
GAT CAC AAG CCG GAT CGT CCG GAC GAG TTG AAG CGG ATC GAG GAG <810
  D  H  K  P  D  R  P  D  E  L  K  R  I  E  E
GCG GGT GGC CGG GTT ATA TAC TGG GAT GGT CCA CGG GTG CTC GGA <855
  A  G  G  R  V  I  Y  W  D  G  P  R  V  L  G
GTT CTC GCC ATG TCA AGA GCC ATA GGT GAC AAT TAT TTG AAG CCG <900
  V  L  A  M  S  R  A  I  G  D  N  Y  L  K  P
TAC GTG AGC TGC GAG CCG GAG GTG ACG ATC ACG GAT CGG ACG GCG <945
  Y  V  S  C  E  P  E  V  T  I  T  D  R  T  A
GAG GAC GAG TGT TTG ATA TTG GCG AGC GAT GGC CTG TGG GAC GTG <990
  E  D  E  C  L  I  L  A  S  D  G  L  W  D  V
GTG TCG AAT GAC ACG GCG TGT GGG GTG GCG AGA ATG TGC CTG AGG<1035
  V  S  N  D  T  A  C  G  V  A  R  M  C  L  R
GGG AAA CGA CTC GCG GCA GCG GCG GCG GAG ACC GAA GGG TCA TCG<1080
  G  K  R  L  A  A  A  A  A  A  E  T  E  G  S  S
GCG GCG TCG TCG GAC AGG GCG TGC TCC GAC GCT TCG ATG CTG CTG<1125
  A  A  S  S  D  R  A  C  S  D  A  S  M  L  L
ACG AAG CTG GCA TTG GCC AGG CAC AGC ACT GAC AAC GTG AGC GTG<1170
  T  K  L  A  L  A  R  H  S  T  D  N  V  S  V
GTC GTG GTG AAT CTG AGG CGC AAC ACG TGT CCT TGA <1206
  V  V  V  N  L  R  R  N  T  C  P  *

ATTTAGGGCTTTTTTTTTGGGGTTGGAAGTTTAGGTTGGGTTTGGTTTGGTTAATCCTATTGGGTCTGGG
AATGGGTCACGGGGTTTTTGGGGAAATGGTAAAGGTGGAGGGTCTGTTTGGCAATGGTAATGGGTCATG
ATGAGCAAAGTTGCGTTTTGAATGAAAATCTGTTTCTAAAAGCCCAACGTAAGTTTAGTTGCTTCCAA
AAACGGGGTAAGAAAATGTAGTTTTTCTAAGCCGAAAAGCTATAAAAAAAGGTTTGGAGTTTT-3'

```

**圖三. *PcPP2CA* 全長核苷酸序列與推演(deduce)的胺基酸序列。**

*PcPP2CA* 全長核苷酸序列計 1574 bp，coding sequence 計 1206 bp，預期可轉譯成由 401 個胺基酸組成之蛋白質。



圖四. PcRACK1 和 Arabidopsis, 大豆(soy bean), 菜豆(snap bean), algae, 蓖麻子(castor bean), 以及 tomato 的 RACK homologs 之胺基酸序列比對。

- GLYma: NP\_001235369.1, Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein [*Glycine max*] (soy bean)
- AtRACK1A: NP\_173248.1, Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein (RACK1A) [*Arabidopsis thaliana*]
- AtRACK1B: NP\_175296.1, Receptor for activated C kinase 1B [*Arabidopsis thaliana*]
- PHAvu: ACV72060.1, RACK1 [*Phaseolus vulgaris*] (snap bean)
- AtRACK1C: NP\_188441.1, Receptor for activated C kinase 1C [*Arabidopsis thaliana*]
- OSTlu: XP\_001421096.1, Receptor of activated protein kinase C 1A, component of 40S small ribosomal subunit [*Ostreococcus lucimarinus* CCE9901] (algae)
- RICco: XP\_002529557.1, Receptor for activated protein kinase C, putative [*Ricinus communis*] (castor bean)
- SOLly: NP\_001233881.1, ArcA2 protein [*Solanum lycopersicum*] (tomato)

```

      *          20          *          40          *          60          *          80
NICta : MAGMCCGVNARTEATTPVPSSEAAARRRMEHQFR-----LAPP--LENGTKRHKVEKVVDS-----KRRKLETSVTISLT : 72
MEDtr : MAFICCGVVEEETLTLVPESSRPSGRSRLDLP-LKYMAD-----PENSERKROLDPSVSPPPP-----FARECNVAVDSCE : 75
FAGsy : MAFICCGVVEGETTAP-ILSSRPSRRRRLDLP-LKIMADVAAP-Q-PLETDKRRKQLCLN-TTSSL-----PSQVVEN-CKVVEE : 77
SOLly : -----VSFGTRTIAP-TEFSEAAARRRMEHQFRFVASTMAVAPPSSVMEGKRRKLEKTVSVKSYDSKEKKQKFERVLSLPS : 81
PRUav : MAGICCGVVGARASTT-ILASSRNSRRRRLDLP-LKYIATMAVKPS-TVENSRRKQKIDLYRSSSSV-----PHNAVSSSEAKS : 80
AtAHG3 : MAGICCGVVEEETFAAP-VDSIRASRRRRLDLP-SIKIVADSAVA-P-PLENCRKRORETVVLSLTP-----GNLDDSNVRSNK : 80
Goshi : MAGTYCGVVGSEAAAAATVFKLRASRRRRLDLP-FKIVALAAVQ-P-PLENDKRRKIDRN-LFLPV-----SSRDCAVAQNSK : 79
PcPP2C : MAFICCGVVEEIDTSSNPECSRAARRRRLDLP-YKFSVGVASP-----FNAEKRRKVEACPTSVSR-----DIDNAHECSGT : 75
ZEAmA : MAFICCEAKSTFATAVAASVATAAAAAVAAS-----SALRRRRLDLPVRRFRVADDP-----EELVADDVRAAKR : 70

      *          100          *          120          *          140          *          160          *          1
NICta : SPLS-VTEK--VVEKE-----FEAKPLDILLESVSVKIERPEVVSGNNEPKTKGTSVCGRRRDMEDAVVHPSC : 141
MEDtr : S--TDEESK---ENE-----VVLEKVVVVEEC-----SPKGLTSVCGRRRDMEDAVSVHPSC : 125
FAGsy : E--NEEKKK---TNK-----NEALHTNCAANSCESSKPEGRNNEEAQVCE-----PKFGVTSVCGRRRDMEDAVSVHPSC : 144
SOLly : LPCTDVGERKLAENKE-----TETNALDLETASVSSNIER---QGVSDGPKFGMTSVCGRRRDMEDAVSIHPSC : 149
PRUav : S--ESEGSK---LNATVRFGDDDFCAVNRGDHQESKSVFVDNEAVQVQALQG-----SPRFGMTSVCGRRRDMEDAVSIHPSC : 155
AtAHG3 : K--ARSAV---TNS-----NSVTEAESFFSDV-----PRKGLTSVCGRRRDMEDAVSIHPSC : 128
Goshi : HGFKNEGLF---SNG-----TVKIMIEKSMEDEKER-----PKFGVTSVCGRRRDMEDAVSIHPSC : 133
PcPP2C : SDEEKVVASLKISAQCR-----PSTSNIPAEASSEL-----PKMGLTSVCGRRRDMEDAVSIHPSC : 132
ZEAmA : QRLARTLSG-----SCLPAGSDSDRFAL-----PRKGLTSVCGRRRDMEDAVSIHPSC : 119

      80          *          200          *          220          *          240          *          260
NICta : KEEN--ENSNLHFYGVYDGHGCSHVAMKCRDRMHEIVANVEVE-KGETQ---WREVMTCSEFSGMENEVHYSSGALGGRS----NCR : 219
MEDtr : RE-----KQDHFVYDGHGCSHVATMCRDLRHEIIVEEVEKEK---VDWSTMEKSEIIMDEEPL--NSSK-TKQSF----SCK : 195
FAGsy : NN-----FHFFGVYDGHGCSHVAMKCRDRMHEIVANVEVESVTEG--MBWDTMSEKSEFDMKDEKQ--EWRV-PIKTI----NCR : 214
SOLly : QDKH--EKSSILHFGLYDGHGCSHVAMKCRDRMHEIVANVEVESAGEAT---WREMTICSEFSKMDKEVVEYSKAGAGGTQTA--DCR : 228
PRUav : QNDG--PDSNGAHFYGVYDGHGCSHVAMKCRDRMHEIVANVEVEEGGY--IQWGMERSFAIMDEEIQ--EGNL-VAQGP----NCR : 232
AtAHG3 : QRNS-----ENHFFGVYDGHGCSHVAMKCRDRMHEIVANVEVESMADSD--PWTEVMKSEFSQMDKEVVSQRECNLVVNGATSRMKNSCR : 209
Goshi : KQSSQVQISSDIHFVYDGHGCSHVAMKCRDRMHEIVANVEVEACGLKAVEMTMKSEFMEDEWR--EWTVNAKESV----TCR : 215
PcPP2C : GRNR--ETVGLKLYFVYDGHGCSHVATMCRDLRHEIIVEEVEEMEE---WRTAMKSEFSVMKDEVW--AWSEGGGVG---HCR : 207
ZEAmA : PGTS-----KHNFVYDGHGCSHVATMCRDRMHEIVANVEVEHXAASGEETAAGVMESESLDECAASWATSRSRDEFA----CR : 196

      *          280          *          300          *          320          *          340          *
NICta : CELQTFPQ-GLAVGSTAVVAVVVTPKRIIVSNGGDSRAVLCRNGVAIPLSDHKFDRPDELRIICAGGRVYWDGFRVLGVLAMSAIGI : 307
MEDtr : CELQTFPQ-GLAVGSTAVVAVVVTPKRIIVSNGGDSRAVLCRNGVAIPLSSDHKFDPRDELRIINAGGRVYWDGFRVLGVLAMSAIGI : 283
FAGsy : CDVQTFPQ-GLAVGSTAVVAIVVTPKRIIVSNGGDSRAVLCRNGVAIPLSSDHKFDPRDELRIICAGGRVYWDGFRVLGVLAMSAIGI : 302
SOLly : CELQTFPQ-GLAVGSTAVVAIVVTPKRIIVSNGGDSRAVLCRNGVAIPLSDHKFDRPDELRIICAGGRVYWDGFRVLGVLAMSAIGI : 316
PRUav : CELQTFPQ-GLAVGSTAVVAVVVTPKRIIVSNGGDSRAVLCRNGVAIPLSSDHKFDPRDELRIICAGGRVYWDGFRVLGVLAMSAIGI : 320
AtAHG3 : CELQTFPQ-GLAVGSTAVVAVVVTPKRIIVSNGGDSRAVLCRNGVAIPLSDHKFDRPDELRIICAGGRVYWDGFRVLGVLAMSAIGI : 297
Goshi : COLRTPQ-GLAVGSTAVVALITPDKRIIVANCGDSRAVLCRNGVAIPLSDHKFDRPDELRIICAGGRVYWDGFRVLGVLAMSAIGI : 303
PcPP2C : CELQTFPQ-GLAVGSTAVVAVVVTPKRIIVANCGDSRAVLCRNGVAIPLSDHKFDRPDELRIICAGGRVYWDGFRVLGVLAMSAIGI : 295
ZEAmA : CEQMLRQ-GLAVGSTAVVAVVVSESHVVAANAGDSRAVLSAGVFWPLSDHKFDRPDELRIICAGGRVYWDGFRVLGVLAMSAIGI : 285
C q P cDAVGSTAVVa663P k66V NcGDSRAVLCrGnVa PLS DHKFDPRDEL RI AGG4VIYWDG FRVLGVLAMSAIGI

      360          *          380          *          400          *          420          *          440
NICta : NYLKPVISEPEVITIERSEDECLILASDGLWDVVNDAAGVARMCLQSRKPPSPHSGPEN-DV-----TVTGAGESST : 382
MEDtr : NYLKPVISEPEVITIERSEDECLILASDGLWDVVNDIACKVQMCLEANKVTTPPGSPG-----LEVAGNSDI : 354
FAGsy : NYLKPVISEPEVITIERSEDECLILASDGLWDVVNDAAGVARMCLAQKPPSPSPSPGN-LM-----AVGAAAGESST : 377
SOLly : NYLKPVISEPEVITIERSEDECLILASDGLWDVVNDAAGVARMCLRS-----GHNSI : 372
PRUav : NYLKPVISEPEVITIERSEDECLILASDGLWDVVNDAAGVARMCLAQKTTSHSESSG-----RLAAVRSI : 390
AtAHG3 : NYLKPVIPEPEVITIERSEDECLILASDGLWDVVNDAAGVARMCLRG-----AG-----AGDSDCAH : 359
Goshi : NYLKPVIPEPEVITIERSEDECLILASDGLWDVVNDAAGVARMCLCARSSFFAPGFSGNEMA-----VKNQALESHI : 379
PcPP2C : NYLKPVIPEPEVITIERSEDECLILASDGLWDVVNDAAGVARMCLRGRKIAAAAAETE-----GSSAASST : 365
ZEAmA : NYLKPVIPEPEVITIERSEDECLILASDGLWDVVNDAAGVARMCLRSGNPFAPFAARPNGLFAAGAGAEEDGSVVRGKEDSI : 374

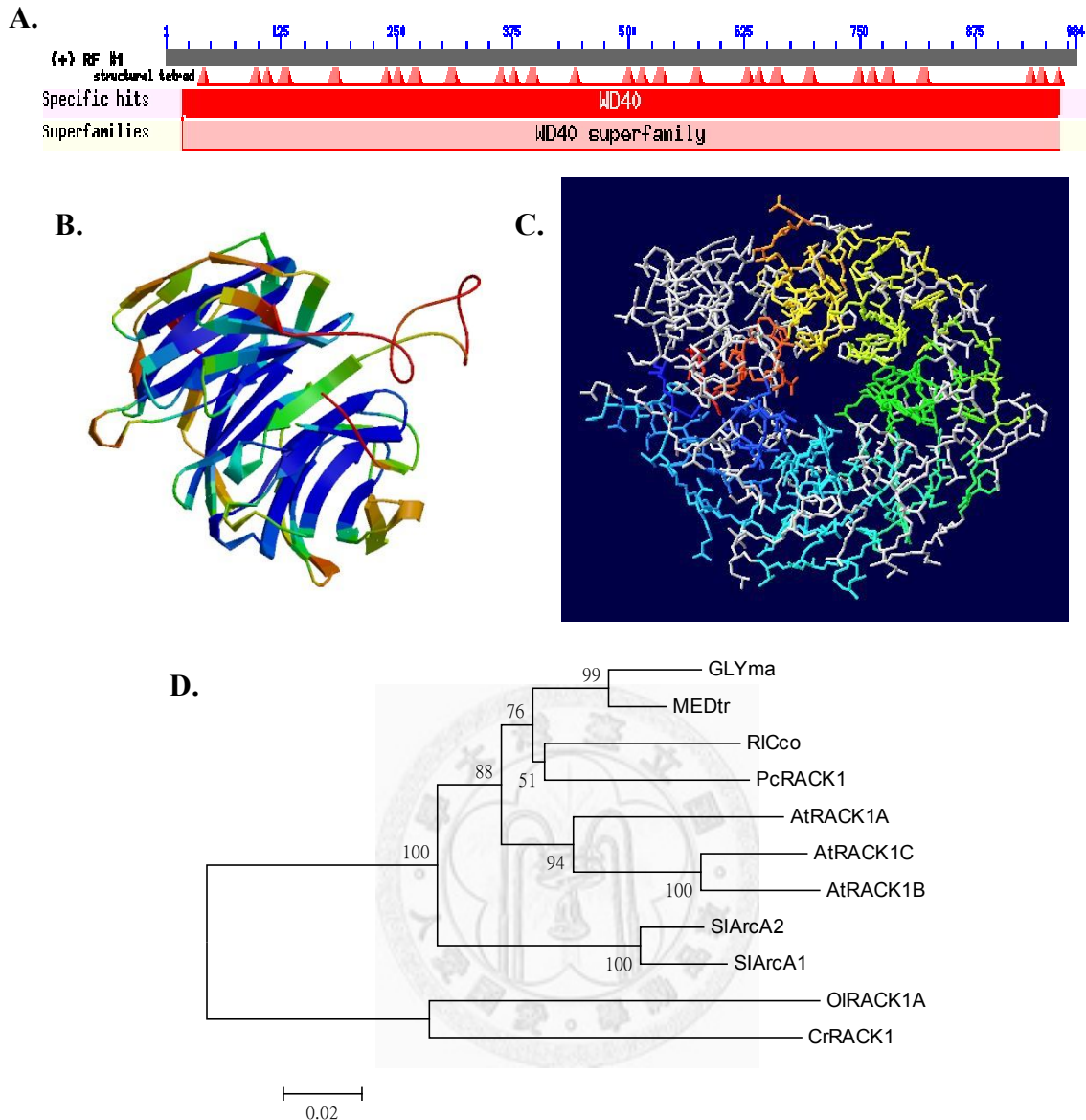
      *          460          *          480
NICta : QLCSDASILLKIALARRSTDNVSVVVVDLR--KDL---- : 416
MEDtr : KACSDASILLKIALARRSNDNVSVVVVDLR--RDQRQ-- : 391
FAGsy : KACSDASILLKIALARRSTDNVSVVVVDLR--RNHQQ-- : 413
SOLly : KACSDASILLKIALARRSNDNVSVVVVDLR--RGL---- : 406
PRUav : KACSDASILLKIALARRSNDNVSVVVVDLR--RPGRC-- : 426
AtAHG3 : NACSDAALLKIALARRSNDNVSVVVVDLRKRNNQASS : 399
Goshi : KCCWASVLLKIALARRSADNVSVVVVDLR--RNQCAN-- : 416
PcPP2C : KACSDASMLLKIALARRSTDNVSVVVVNLN--RNTCP-- : 401
ZEAmA : KACSDAAMLKIALARRSADNVSVVVVDLR--RGI---- : 408

```

圖五. PcPP2CA 和菸草(tobacco), 蒺藜苜蓿(barrel medic), 歐洲山毛櫸 (European beech), 番茄(tomato), 歐洲甜櫻桃(sweet cherry), 阿拉伯芥, 棉花 (cotton), 以及玉米(corn)的 PP2C homologs 之胺基酸序列比對。

NICta: CAC10358.1, Protein phosphatase 2C [*Nicotiana tabacum*] (tobacco)  
MEDtr: XP\_003616468.1, Protein phosphatase 2C [*Medicago truncatula*] (barrel medic)  
FAGsy: CAB90633.1, Protein phpsphatase 2C (PP2C) [*Fagus sylvatica*] (European beech)  
SOLly: NP\_001234692.1, Protein phosphatase 2C - AHG3 homolog [*Solanum lycopersicum*]  
PRUAV: AAQ03211.1, protein phosphatase 2C [*Prunus avium*] (sweet cherry)  
AtAHG3/AtPP2CA: NP\_187748.1, protein phosphatase 2C 37 [*Arabidopsis thaliana*]  
Goshi: ABC16634.1, protein phosphatase PP2C [*Gossypium hirsutum*] (cotton)  
ZEAmA: NP\_001149037.1, protein phosphatase 2C [*Zea mays*] (corn)





**圖六. PcRACK1 蛋白質結構及基因樹(gene tree)**

A, 將 PcRACK1 全長胺基酸序列上傳 blastx (NCBI) 進行比對, 而得出的 conserved domain。B, PcRACK1 之胺基酸序列經由 GENO3D 和 SWISS- MODEL 網站分析後產生的可能的蛋白質模型。C, PcRACK1 之胺基酸序列經由 GENO3D 網站分析後, 以 Swiss-PdbViewer 軟體進行旋轉所得之可能的蛋白質模型。D, 使用 blastx (NCBI) 找出近似基因的胺基酸序列, 以 MEGA5 軟體畫出之 Neighbor-Joining 基因樹。

```

MEDsa : --MAEGLVLRGTMRAHTDVVTAIATPIDNSDMIVTASRDKSIILWHLTK-----EDKTYGVPRRLTGHSHFVQDVVLLSS
NICta : --MSQESLVRGTMRAHTDWMVTAIATAVDNSDMIVTSSRDKSIIVWSITK-----DGPQYGVPRRLTGHSHFVQDVVLLSS
PcRACK1 : --MAETLVLRGTMRAHTDMVTAIAIATPIDNSEMIVSASRDKSIILWHLTK-----DEKTYGVPRRLTGHSHFVQDVVLLSS
At_RACK1A : --MAEGLVLRGTMRAHTDMVTAIATPIDNADIIVSASRDKSIILWHLTK-----DDKAYGVAQRRLTGHSHFVEDVLLSS
At_RACK1B : --MAEGLVLRGTMCAHTDMVTAIATFVDNSDVIVTSSRDKSIILWHLTK-----EDKSYGVAQRRLTGHSHFVQDVVLLSS
At_RACK1C : --MAEGLVLRGIMRAHTDIVTAIATPIDNSDIIVTASRDKSIILWHLTK-----DDKSYGVAQRRLTGHSHFVEDVLLSS
HOMsa_1 : --MTEQMLRGTLLKGGHNGWVLTQIATTPQFPDMILSASRDKTIIMWKLTR-----DETNYGIPQRRLTGHSHFVSDVVTSS

MEDsa : DGQFALSGSWDGE LRLWD LNAGT SARRFV GHTRDVLSVAF SIDNRQIVSASRDRTIKLWN TLGEC KYTIQDG ----DAHS DWVSCV
NICta : DGMFALSGSWDGE LRLWDLQAGT TARRFV GHTRDVLSVAF SIDNRQIVSASRDKSIIRLWN TLGEC KYTIQDG ----DSHS DWVSCV
PcRACK1 : DGQFALSGSWDGE LRLWDLALGV SARRFV GHTRDVLSVAF SIDNRQIVSASRDRTIKLWN TLGEC KFTIQDG ----DGHG DWVSCV
At_RACK1A : DGQFALSGSWDGE LRLWDLAAGV STRRFV GHTKDVLSVAF SIDNRQIVSASRDRTIKLWN TLGEC KYTISEGG ----EGHR DWVSCV
At_RACK1B : DGQFALSGSWDGE LRLWDLATGE STRRFV GHTKDVLSVAF SIDNRQIVSASRDRTIKLWN TLGEC KYTISEA ----DGHK EWVSCV
At_RACK1C : DGQFALSGSWDGE LRLWDLATGE TTRRFV GHTKDVLSVAF SIDNRQIVSASRDRTIKLWN TLGEC KYTISEG ----DGHK EWVSCV
HOMsa_1 : DGQFALSGSWDGT LRLWDLTTGTTTRRFV GHTKDVLSVAF SIDNRQIVSASRDRTIKLWN TLGVC KYTVQDE ----SHSE WVSCV

MEDsa : RFSFPTPOPTIIVSASWDRTVKVWNLNCKLRNLTLAGHSGYVNTVAVSPDGS LCA SGGKDG VILLWDLAEGKRLYS LDAGS I IHALC
NICta : RFSFNNLQOPTIIVSASWDRTVKIWNLTNCKLRRLTLAGHTGYVNTPAVSPDGS LCA SGGKDG VILLWDLAEGKRLYS LESGSI IHS LC
PcRACK1 : RFSFNTLQOPTIIVSASWDRTVKVWNLNCKLRCTLEGHNGYVNTVAVSPDGS LCA SGGKDG VILLWDLAEGKRLYS LGAGAI IHALC
At_RACK1A : RFSFNTLQOPTIIVSASWDRTVKVWNLNCKLRSTLAGHTGYVNTVAVSPDGS LCA SGGKDG VILLWDLAEGKRLYS LEANSV IHALC
At_RACK1B : RFSFNTLVPTIIVSASWDRTVKVWNLQNC LKRNLTLAGHSGYVNTVAVSPDGS LCA SGGKDG VILLWDLAEGKRLYS LEAGSI IHS LC
At_RACK1C : RFSFNTLVPTIIVSASWDRTVKVWNLQNC LKRNLSLVGHSGYVNTVAVSPDGS LCA SGGKDG VILLWDLAEGKRLYS LEAGSI IHS LC
HOMsa_1 : RFSFNSSNFIIVSOGWDKLVKWNLANCKLKTNHI GHTGYLNTVTVSPDGS LCA SGGKDGQAMLWDLNEGKRLYTL DGGDI IHALC

MEDsa : FSPNRYWLC AATESSIKIWDLESKSI VEDLKVLDKTEADAAIGD TT-TKKK--VIYCTSLNWSADGSTLFSGYTDGVVRVWGIGR
NICta : FSPNRYWLC AATESSIKIWDLESKSI VDDLKVDLKQESEMSS EGTAS---GKNKVIYCTSLSWSADGSTLFSGYTDGLIRVWGIDR
PcRACK1 : FSPNRYWLC AATEQS IKIWDLESKQI VEDLKVLDKTEAEKTEDTHAA-TAYKKKVIYCTSLNWSADGSTLFSGYSDG VIRVWGIGR
At_RACK1A : FSPNRYWLC AATEHG IKIWDLESKSI VEDLKVLDKAEAEKADNSGPA--ATKRKVIYCTSLNWSADGSTLFSGYTDG VIRVWGIGR
At_RACK1B : FSPNRYWLC AATENSIRIWDLESKSV VEDLKVLDKAEAEKTDGSGTI--GNKTKVIYCTSLNWSADGNTLFSGYTDG VIRVWGIGR
At_RACK1C : FSPNRYWLC AATENSIRIWDLESKSV VEDLKVLDKSEA EKNEGGVGT--GNQKKVIYCTSLNWSADGSTLFSGYTDG VIRVWGIGR
HOMsa_1 : FSPNRYWLC AATGPS IKIWDLE GKII VDELKQEVIST S-----SKAEP PQCTSLAWSADGQTLFAGYTDNLVRVWQVTI

MEDsa : Y----- : 325
NICta : Y----- : 326
PcRACK1 : Y----- : 327
At_RACK1A : Y----- : 327
At_RACK1B : Y----- : 326
At_RACK1C : Y----- : 326
HOMsa_1 : GTRL----- : 318

```

圖七. PcRACK1 和紫花苜蓿、菸草、阿拉伯芥和人類的 RACK homologs 之胺基酸序列的 WD40 保守序列比對。

MEDsa: O24076.1, Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein [*Medicago sativa*]

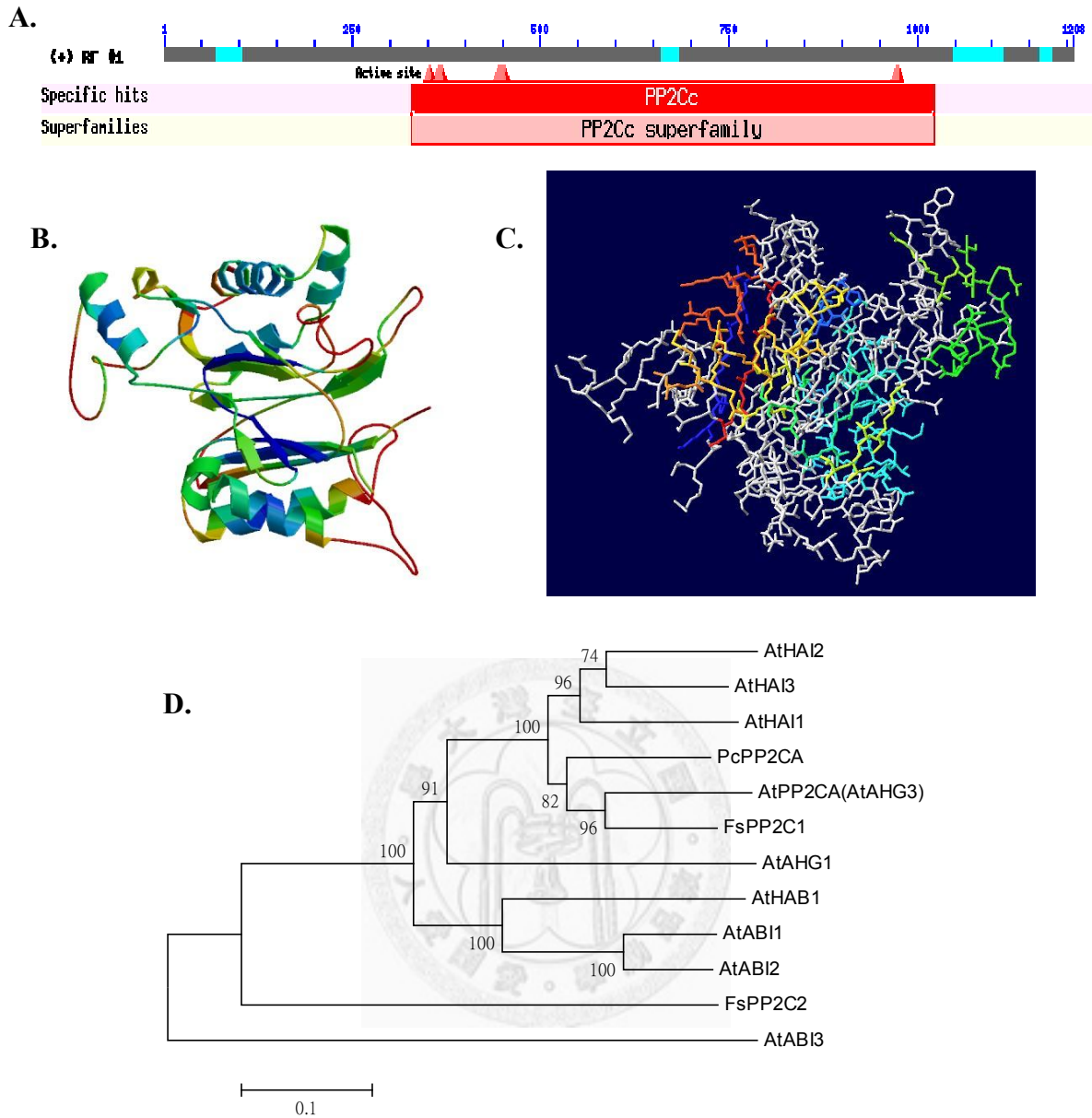
NICta: P49026.1, Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein [*Nicotiana tabacum*]

At\_RACK1A: NP\_173248.1, Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein (RACK1A) [*Arabidopsis thaliana*]

At\_RACK1B: NP\_175296.1, Receptor for activated C kinase 1B [*Arabidopsis thaliana*]

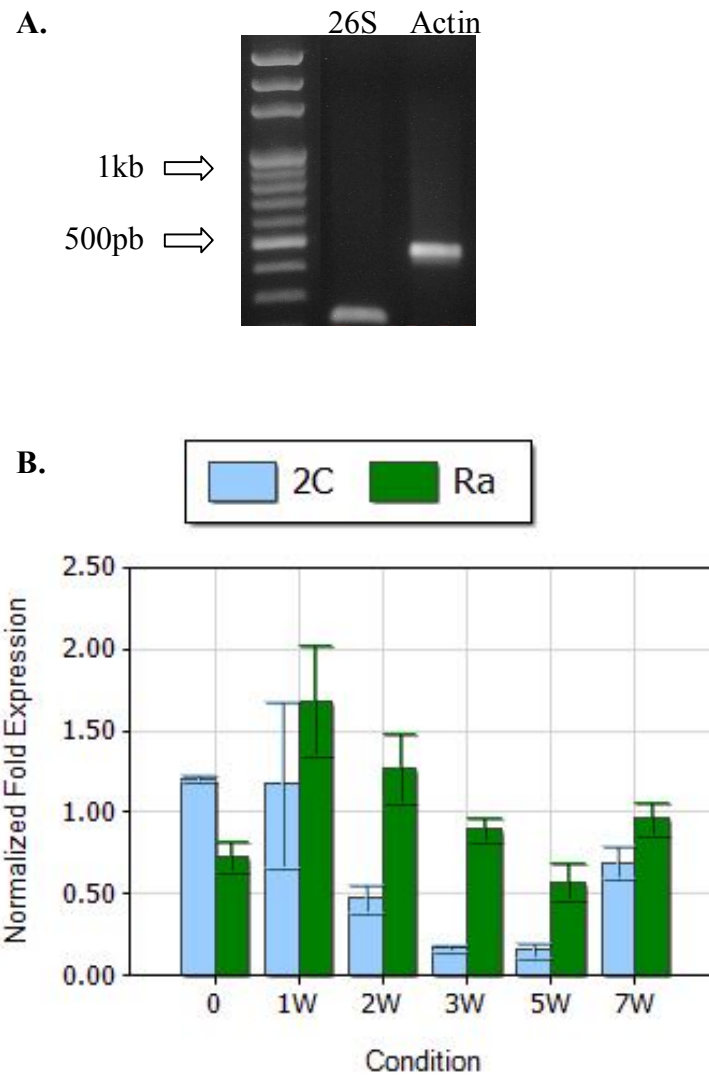
At\_RACK1C: NP\_188441.1, Receptor for activated C kinase 1C [*Arabidopsis thaliana*]

HOMsa\_1: AAP36938.1, *Homo sapiens* guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1 [synthetic construct] [*Homo sapiens*]



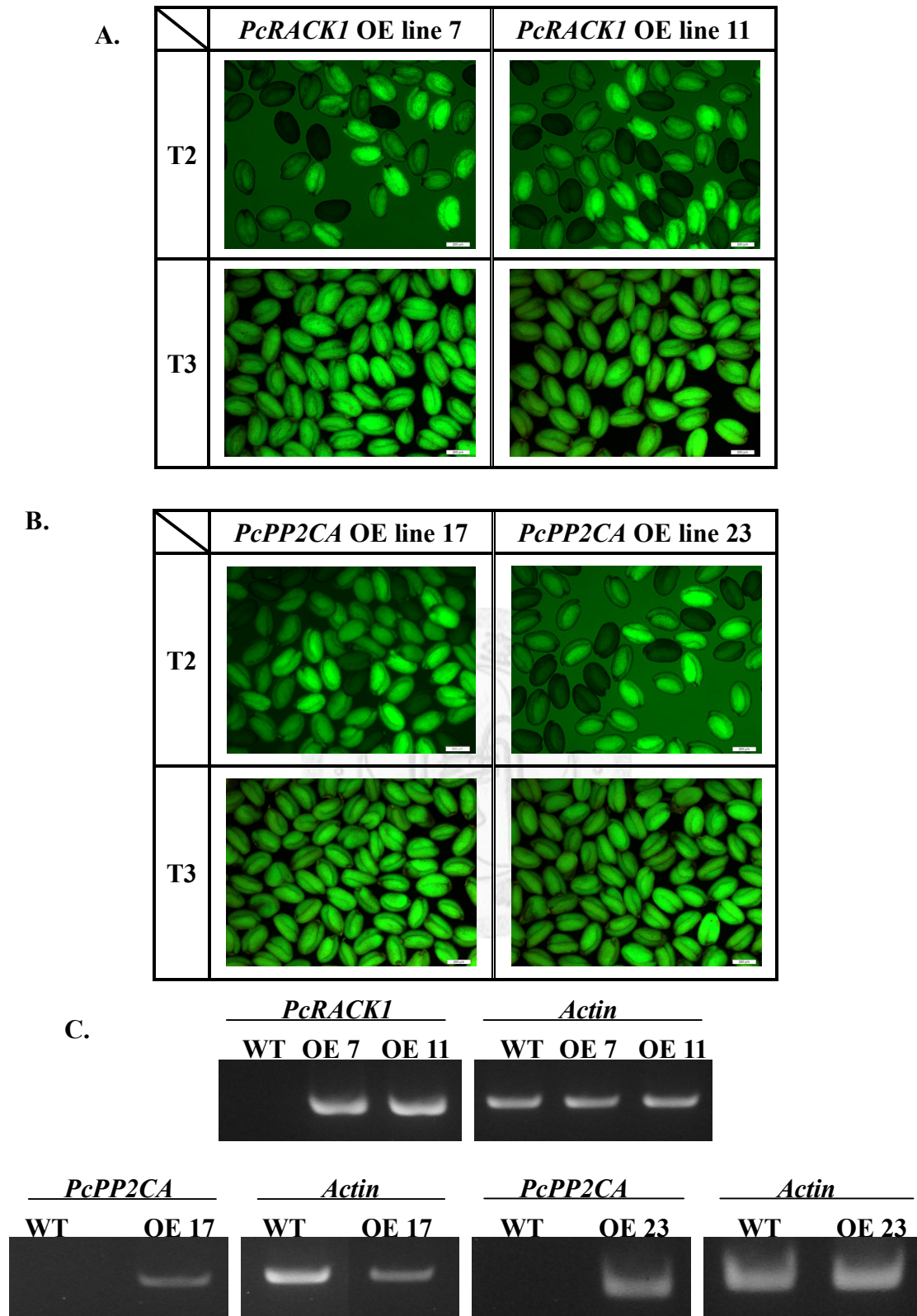
**圖八. PcPP2CA 蛋白質結構及基因樹(gene tree)**

A, 將 PcPP2CA 全長胺基酸序列上傳 blastx (NCBI) 進行比對, 而找出的 conserved domain。B, PcPP2CA 之胺基酸序列經由 GENO3D 和 SWISS-MODEL 網站分析後產生的可能的蛋白質模型。C, PcPP2CA 之胺基酸序列經由 GENO3D 網站分析後, 以 Swiss-PdbViewer 軟體進行旋轉所得之可能的蛋白質模型。D, 使用 blastx (NCBI) 找出近似基因的胺基酸序列, 以 MEGA5 軟體畫出之 Neighbor-Joining 基因樹。

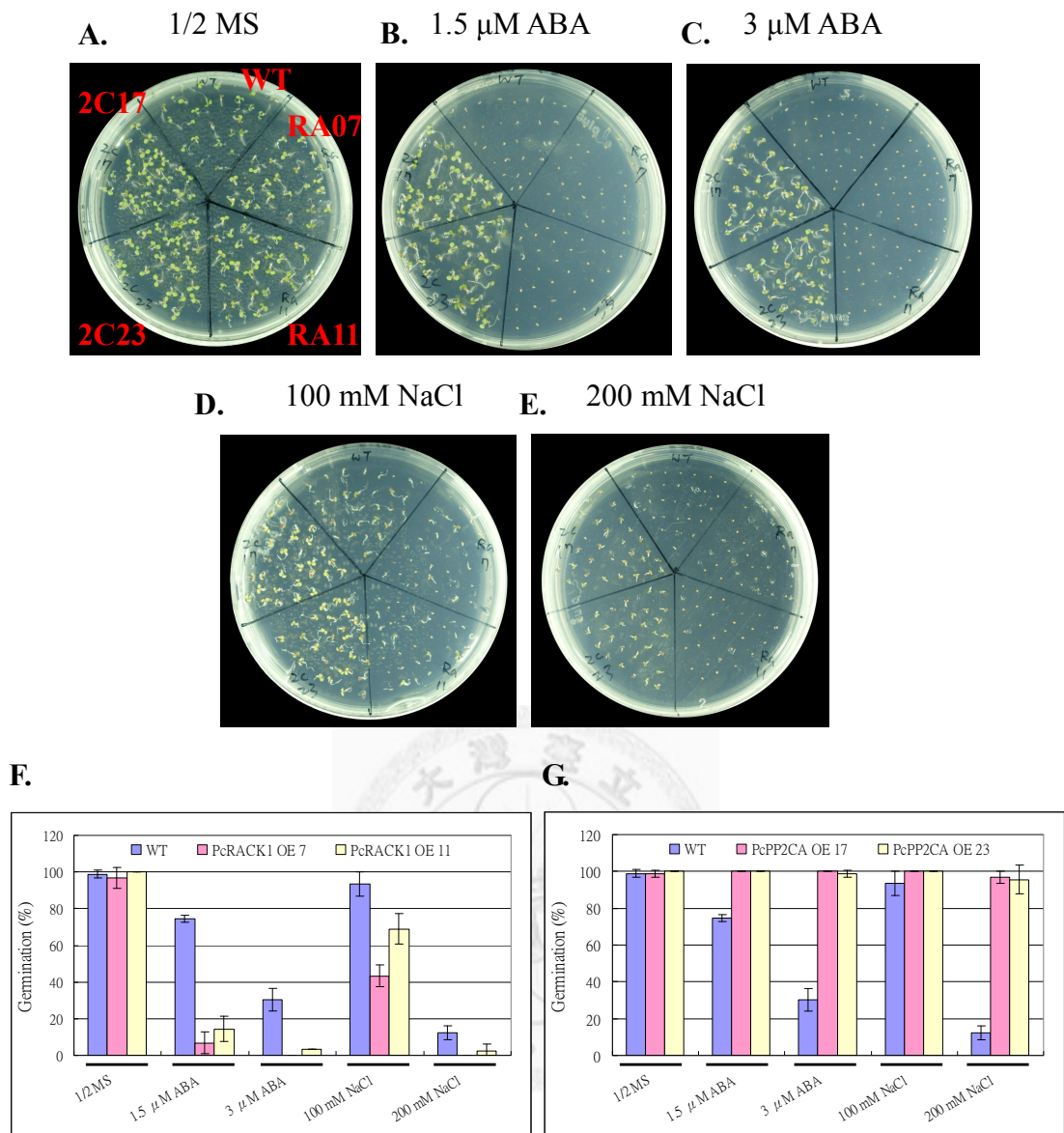


**圖九. 經 0, 1, 2, 3, 5, 7 天暖溫層積處理之山櫻花胚軸中 *PcRACK1* 和 *PcPP2CA* 的表現量變化**

A, 以山櫻花胚軸之 cDNA 做 template 進行 PCR 實驗，左邊使用魯(2011)設計之山櫻花 *26S rRNA* primers，右邊使用自行設計之山櫻花 *actin* primers。B, 以暖溫層積處理不同時間的山櫻花胚軸之 cDNA 做 template 進行 Real time PCR 實驗，以山櫻花 *actin* 做 reference gene，每個數據為三重複之平均值與標準差。0: 暖溫層積處理 0 天。1W: 暖溫層積 1 天。2W: 暖溫層積 2 天。3W: 暖溫層積 3 天。5W: 暖溫層積 5 天。7W: 暖溫層積 7 天。

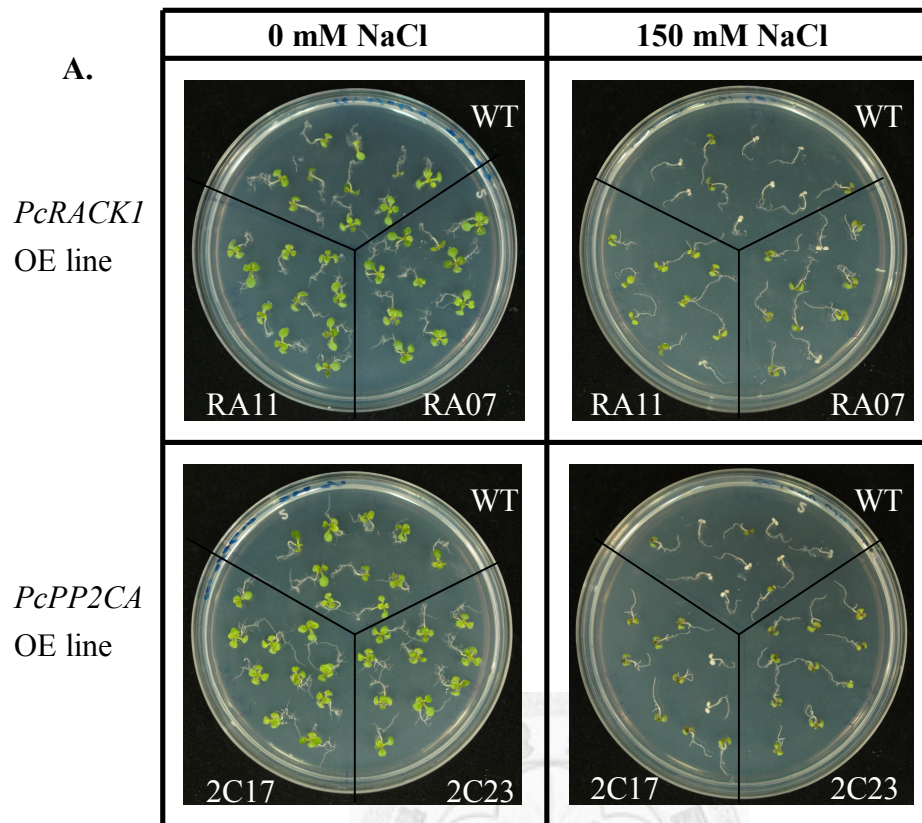


圖十. 利用發光種子技術以螢光篩選 *PcRACK1* OE line 及 *PcPP2CA* OE line  
 A, 於螢光顯微鏡下篩選發綠色螢光的轉植株種子。A, *PcRACK1* OE line 7 和 11 的 T2 和 T3 代種子。B, *PcPP2CA* OE line 17 和 23 的 T2 和 T3 代種子。C, 以 T3 代植株之 cDNA 進行 PCR 以檢測轉入基因的表現量。橫線上方表示受檢測的基因，下方為受測的植株。

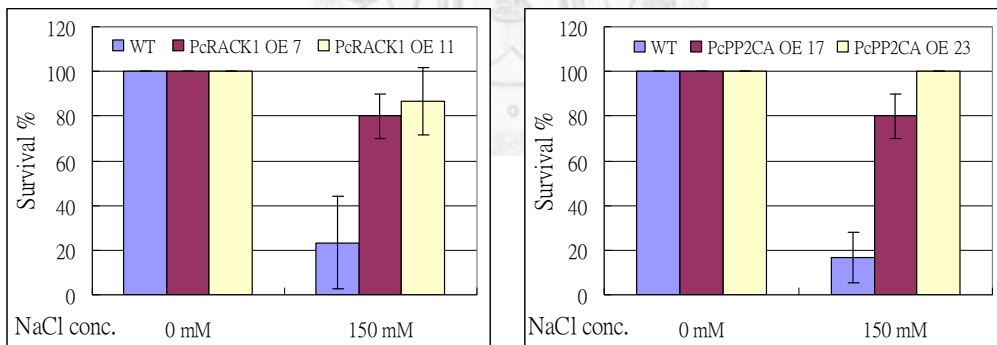


**圖十一. 轉基因阿拉伯芥之種子發芽率測定**

種子消毒洗淨，於 4 °C 黑暗下春化 3~5 天，以玻璃滴管將種子點在畫好分隔線的培養皿上，以透氣膠布封皿，置於生長室培養。A、B、C、D 和 E, 第五天的發芽情況。A, 1/2 MS 培養基、B, 1.5  $\mu$ M ABA, 1/2 MS 培養基、C, 3  $\mu$ M ABA, 1/2 MS 培養基、D, 100 mM NaCl, 1/2 MS 培養基、E, 200 mM NaCl, 1/2 MS 培養基。培養皿分五區，上為 WT、右上為 *PcRACK1* OE line 7、右下為 *PcRACK1* OE line 11、左上為 *PcPP2CA* OE line 17、左下為 *PcPP2CA* OE line 23。F, 野生型與 *PcRACK1* OE line 在外加 ABA 或 NaCl 培養基上第 5 天的發芽率，每個數據代表三重複的平均發芽率與標準差(mean  $\pm$  SD)。G, 野生型與 *PcPP2CA* OE line 在外加 ABA 或 NaCl 培養基上第 5 天的發芽率，每個數據代表三重複的平均發芽率與標準差(mean  $\pm$  SD)。

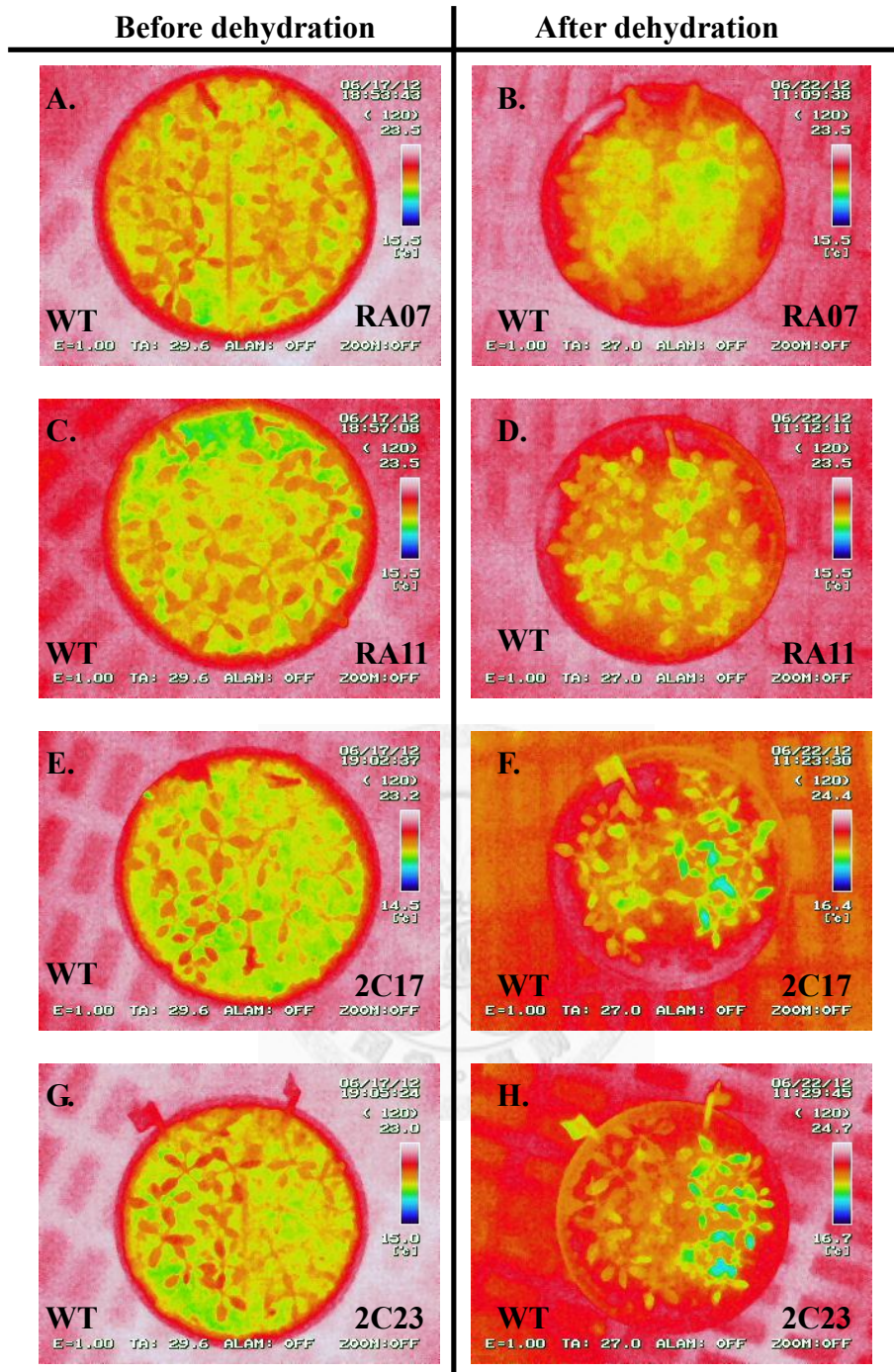


**B.**



**圖十二. 轉殖株幼苗在高鹽逆境下之存活率測定**

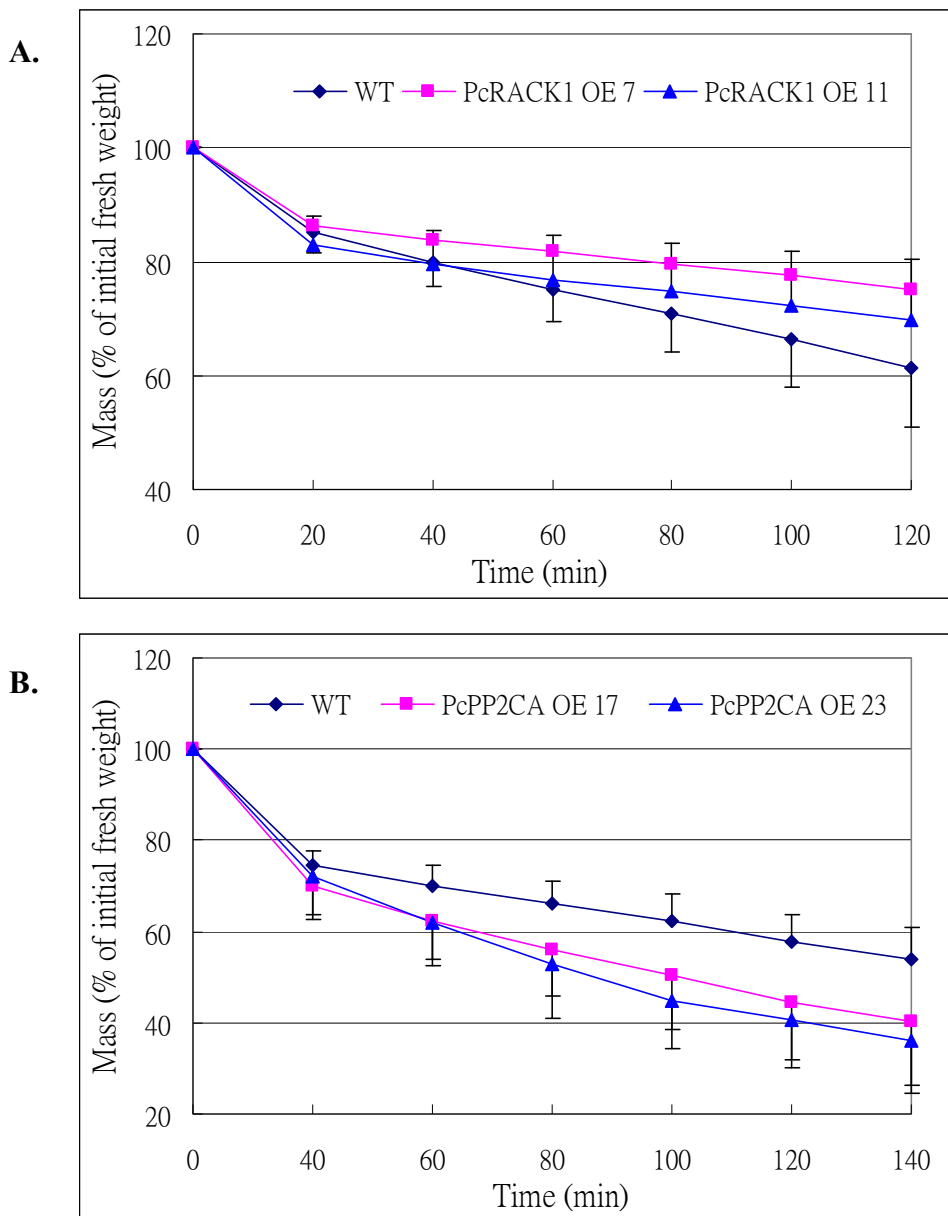
將無菌培養 3 天大的幼苗移至畫好分隔線並做好標記的 1/2 MS 和 150 mM NaCl, 1/2 MS 培養皿上。每個 line 10 株。之後以透氣膠布封皿，放於生長室培養，7 天後觀察並拍照。A, 第七天之生長情形。B, 每個數據代表十株三重複的平均存活率與標準差(mean ± SD)。



圖十三. *PcRACK1* OE line 和 *PcPP2CA* OE line 在乾旱五天後葉部紅外線溫度影像圖

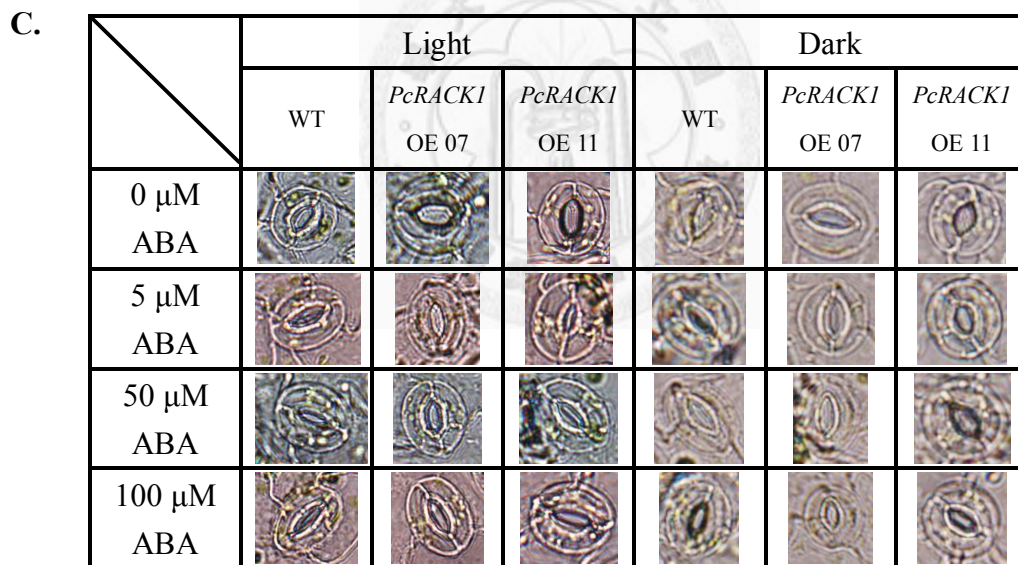
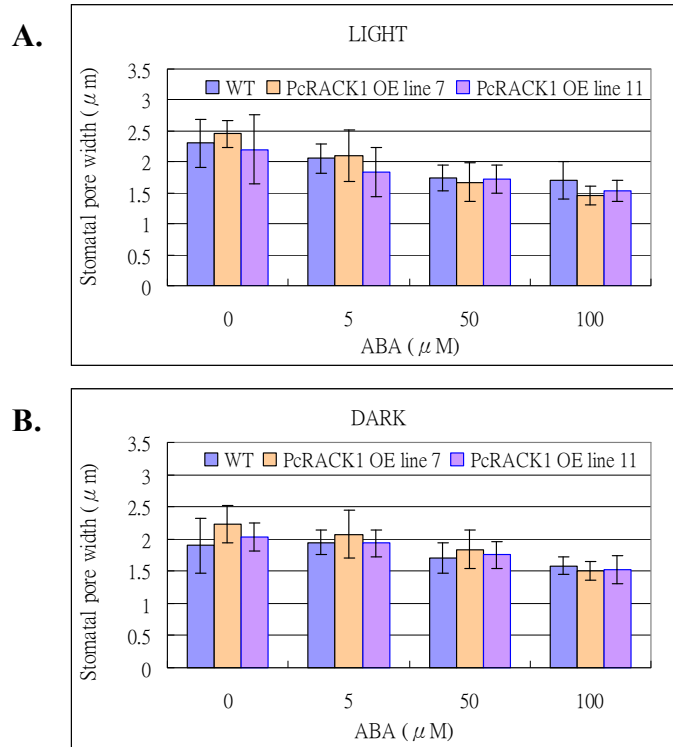
圖中最高溫者為白色，其次為紅色，再次為黃色，再次之為綠色，最低溫者為藍色(圖右側溫標)。A、C、E 和 G 為三周大正常環境生長的植株之紅外線影像照片；圖 B、D、F、H 為其左圖植株乾旱處理 5 天後的紅外線影像照片。A, 左 WT、右 *PcRACK1* OE line 7。C, 左 WT、右 *PcRACK1* OE line 11。E, 左 WT、右 *PcPP2CA* OE line 17。G, 左 WT、右 *PcPP2CA* OE line 23。





**圖十四. *PcRACK1* OE line 和 *PcPP2CA* OE line 之離體葉片失水速率實驗**

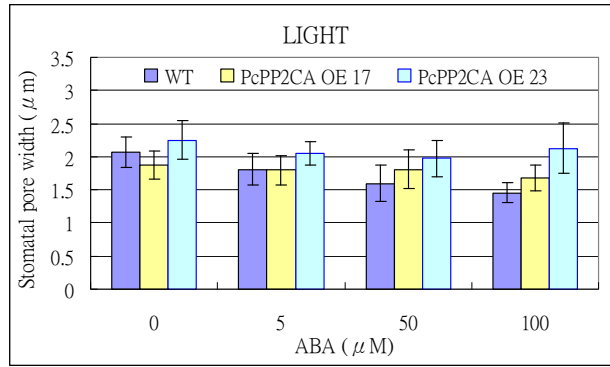
以五周大的植株做材料。葉片剪下以微量天平測量重量後，每隔 20 分鐘測一次。A, *PcRACK1* OE line 的失水速率實驗。每個數據代表 1 片葉子三重複的平均重量比((Leaf weight/Fresh weight)\*100%)與標準差(mean ± SD)。B, *PcPP2CA* OE line 的失水速率實驗。每個數據代表 5 片葉子三重複的平均重量比((Leaf weight/Fresh weight)\*100%)與標準差(mean ± SD)。



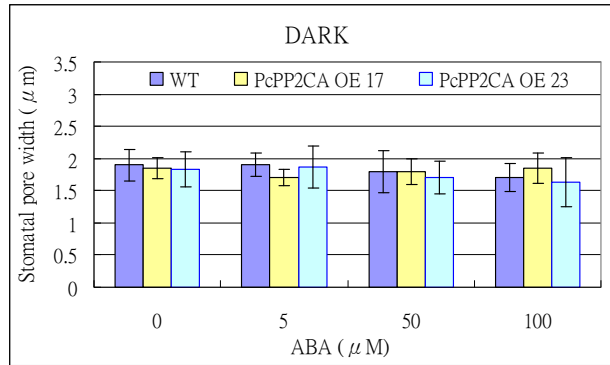
**圖十五. *PcRACK1* OE line 在 ABA 處理下氣孔孔徑變化測量實驗**

以五周大的植株做材料。葉片剝取下表皮後泡入 MES 溶液中，光或暗處理 2.5 小時，之後添加定量 ABA 再光照 2.5 小時，之後壓成玻片在顯微鏡下觀察拍照。A, 光處理之氣孔實驗，每個數據代表 60 顆氣孔孔徑寬度(pore width)的平均值與標準差(mean  $\pm$  SD)。B, 暗處理之氣孔實驗，每個數據代表 60 顆氣孔孔徑寬度(pore width)的平均值與標準差(mean  $\pm$  SD)。C, 光、暗處理下野生型、*PcRACK1* OE line 7 和 *PcRACK1* OE line 11 的氣孔照片。

A.



B.

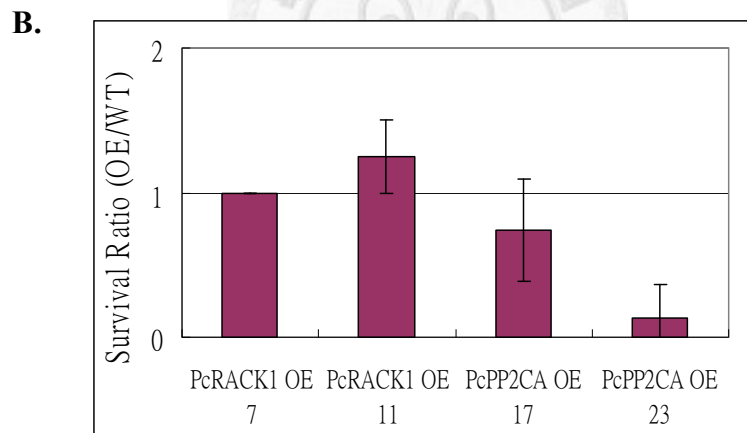
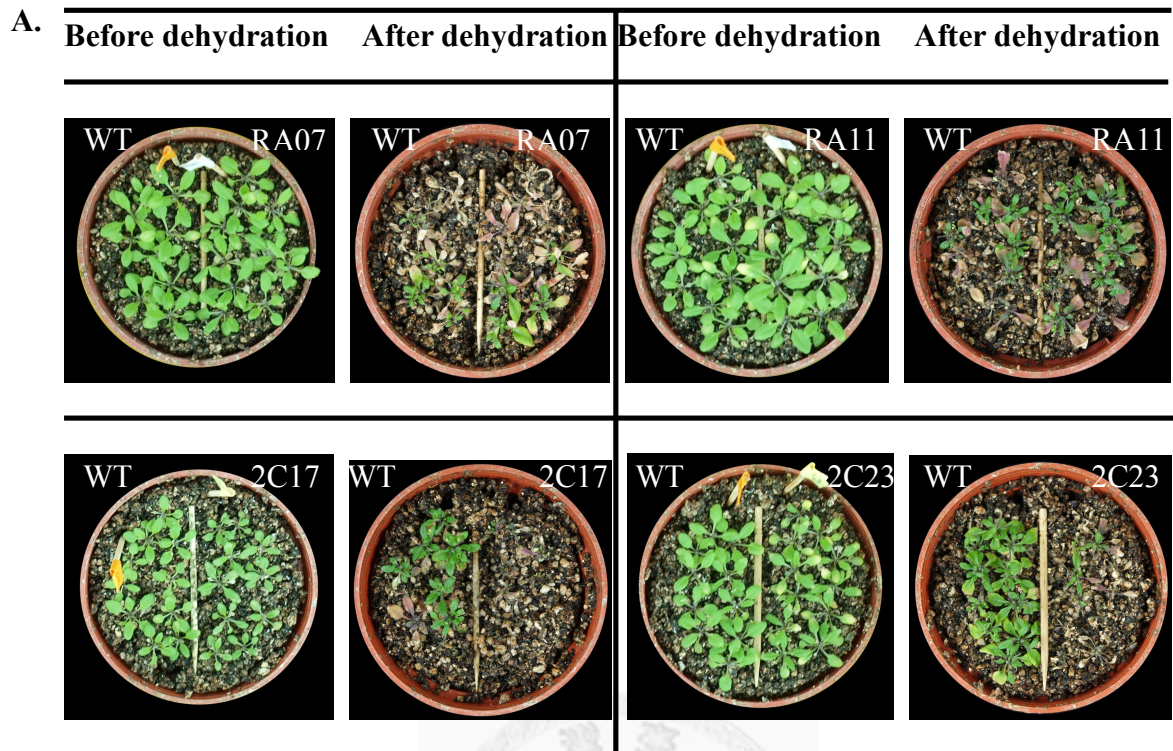


C.

	Light			Dark		
	WT	<i>PcPP2CA</i> OE 17	<i>PcPP2CA</i> OE 23	WT	<i>PcPP2CA</i> OE 17	<i>PcPP2CA</i> OE 23
0 μM ABA						
5 μM ABA						
50 μM ABA						
100 μM ABA						

圖十六. *PcPP2CA* OE line 在 ABA 處理下氣孔孔徑變化測量實驗

以五周大的植株做材料。葉片剝取下表皮後泡入 MES 溶液中，光或暗處理 2.5 小時，之後添加定量 ABA 再光照 2.5 小時，之後壓成玻片在顯微鏡下觀察拍照。A, 光處理之氣孔實驗，每個數據代表 60 顆氣孔孔徑寬度(pore width)的平均值與標準差(mean ± SD)。B, 暗處理之氣孔實驗，每個數據代表 60 顆氣孔孔徑寬度(pore width)的平均值與標準差(mean ± SD)。C, 光、暗處理下野生型、*PcPP2CA* OE line 17 和 *PcPP2CA* OE line 23 的氣孔照片。



圖十七. *PcRACK1* OE line 和 *PcPP2CA* OE line 之乾旱耐受性實驗

3 周大植株不再澆水並移去底盆，經過 12~19 天的乾旱處理後重新開始澆水，回水 5~7 天後拍照並計算存活株數。A, 植株在乾旱處理前與回水後的生長情形，每盆左邊為野生型，右邊為轉植株，每邊各種十株，做三重複。B, 每個數據代表十株三重複的 survival ratio [即 (average OE line survival rate) / (average wild type survival rate)] 與標準差 (mean  $\pm$  SD)。

## 參考文獻

- 臺灣大學農藝系種子研究室 <http://seed.agron.ntu.edu.tw/vtseed/dormancy/dor2.htm>  
Plant Physiology, Fifth Edition online , Topic 23.18 Types of Seed Dormancy and the Roles of Environmental Factors. <http://5e.plantphys.net/article.php?ch=23&id=8>
- 陳舜英 (2008) 山櫻花和楊梅種子之休眠及解除機制。國立臺灣大學森林環境暨資源研究所博士論文。1-88 頁。
- 簡慶德 (2004) 本土櫻屬種苗之培育技術。台灣林業期刊 **30**(2): 36-39.
- 李大紅、張冬平、曹丹丹、梁建生 (2011) 植物 RACK1 蛋白研究進展。植物學報(Chinese Bulletin of Botany) **46**(2): 224-232.
- 魯建宇 (2011) 暖溫層積處理過程中山櫻花休眠種子的基因調控。國立臺灣大學國立台灣大學植物科學研究所碩士論文。1-76 頁。
- 阮海華 (2007) 植物 PP2C 蛋白磷酸酶負調控 ABA 信號轉導途徑研究進展。安徽農業科學(Journal of Anhui Agricultural Sciences) **35**(3): 652-653.
- Adams, D.R., Ron, D., and Kiely, P.A. (2011) RACK1, A multifaceted scaffolding protein: Structure and function. Cell Communication and Signaling **9**(1): 22.
- Ali-Rachedi, S., Bouinot, D., Wagner, M.H., Bonnet, M., Sotta, B., Grappin, P., and Jullien, M. (2004) Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of *Arabidopsis thaliana*. Planta **219**(3): 479-488.
- Antoni, R., Gonzalez-Guzman, M., Rodriguez, L., Rodrigues, A., Pizzio, G. A., and Rodriguez, P. L. (2012) Selective Inhibition of Clade A Phosphatases Type 2C by PYR/PYL/RCAR Abscisic Acid Receptors. Plant Physiology **158**(2): 970-980.
- Barrero, J.M., Millar, A.A., Griffiths, J., Czechowski, T., Scheible, W.R., Udvardi, M., Reid, J.B., Ross, J.J., Jacobsen, J.V., and Gubler, F. (2010) Gene expression profiling identifies two regulatory genes controlling dormancy and ABA sensitivity in Arabidopsis seeds. Plant Journal **61**(4): 611-22.
- Baskin, J.M., and Baskin, C.C. (2004). A classification system for seed dormancy. Seed Science Research **14**(1): 1-16.
- Bewley, J.D. (1980) Secondary dormancy (skotodormancy) in seeds of lettuce (*Lactuca sativa* cv. Grand Rapids) and its release by light, gibberellic acid and benzyladenine. Physiologia Plantarum **49**(3): 277-280.
- Bogre, L., Ligterink, W., Meskiene, I., Barker, P.J., Heberle-Bors, E., Huskisson, N.S., and Hirt, H. (1997) Wounding induces the rapid and transient activation of a specific MAP kinase pathway. Plant Cell **9**(1): 75-83.
- Chien, C.T., Chen, S.Y., and Yang, J.C. (2002) Effect of stratification and drying on

- the germination and storage of *Prunus campanulata* seeds. *Taiwan Journal of Forest Science* **17**(4): 413–420.
- Chen, J.G., Ullah, H., Temple, B., Liang, J., Guo, J., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Jones, A.M.** (2006) *RACK1* mediates multiple hormone responsiveness and developmental processes in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **57**(11): 2697-2708.
- Chen, S.Y., Chien, C.T., Chung, J.D., Yang, Y.S., and Kuo, S.R.** (2007) Dormancy-break and germination in seeds of *Prunus campanulata* (Rosaceae): role of covering layers and changes in concentration of abscisic acid and gibberellins. *Seed Science Research* **17**(1): 21-32.
- Cohen, P., Klumpp, S., and Schelling, D.L.** (1989) An improved procedure for identifying and quantitating protein phosphatases in mammalian tissues. *FEBS Letters* **250**(2): 596-600.
- Das, A.K., Helps, N.R., Cohen, P.T.W., and Barford, D.** (1996) Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution. *EMBO Journal* **15**(24): 6798-6809.
- Derkx, M.P.M., and Karssen, C.M.** (1993) Effects of light and temperature on seed dormancy and gibberellin-stimulated germination in *Arabidopsis thaliana*: studies with gibberellin-deficient and -insensitive mutants. *Physiologia Plantarum* **89**(2): 360–368.
- Finch-Savage, W.E., and Leubner-Metzger, G.** (2006) Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist* **171**(3): 501–523.
- Finkelstein, R., Reeves, W., Ariizumi, T., and Steber, C.** (2008) Molecular Aspects of Seed Dormancy. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 387-415.
- Gagne, J.M., and Clark, S.E.** (2007) The Protein Phosphatases POL and PLL1 are Signaling Intermediates for Multiple Pathways in Arabidopsis. *Plant Signaling and Behavior* **2**(4): 245-246.
- Gaits, F., Shiozaki, K., and Russell, P.** (1997) Protein phosphatase 2C acts independently of stress-activated kinase cascade to regulate the stress response in fission yeast. *Journal of Biological Chemistry* **272**(28): 17873-17879.
- Giraudat, J., Hauge, B.M., Valon, C., Smalle, J., Parcy, F., and Goodman, H.M.** (1992) Isolation of the Arabidopsis *ABI3* gene by positional cloning. *Plant Cell* **4**(10): 1251-1261.
- González-García, M.P., Rodríguez, D., Nicolás, C., Rodríguez, P.L., Nicolás, G., and Lorenzo, O.** (2003) Negative Regulation of Abscisic Acid Signaling by the *Fagus sylvatica* FsPP2C1 Plays A Role in Seed Dormancy Regulation and Promotion of Seed Germination. *Plant Physiology* **133**(1): 135-144.
- Grappin, P., Bouinot, D., Sotta, B., Miginiac, E., and Jullien, M.** (2000) Control of

- seed dormancy in *Nicotiana plumbaginifolia*: post-imbibition abscisic acid synthesis imposes dormancy maintenance. *Planta* **210**(2): 279–285.
- Groot, S.P.C., and Karszen, C.M.** (1987) Gibberellins regulate seed germination in tomato by endosperm weakening: a study with gibberellin-deficient mutants. *Planta* **171**(4): 525-531.
- Groot, S.P.C., and Karszen, C.M.** (1992) Dormancy and germination of abscisic acid-deficient tomato seeds: studies with the sitiens mutant. *Plant Physiology* **99**(3): 952-958.
- Guo, J., and Chen, J.** (2008) *RACK1* genes regulate plant development with unequal genetic redundancy in Arabidopsis. *BMC Plant Biology* **8**: 108.
- Guo, J., Wang, S., Wang, J., Huang, W., Liang, J., and Chen, J.** (2009a) Dissection of the Relationship Between RACK1 and Heterotrimeric G-Proteins in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* **50**(9): 1681-1694.
- Guo, J., Wang, J., Xi, L., Huang, W.D., Liang, J., and Chen, J.G.** (2009b) RACK1 is a negative regulator of ABA responses in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **60**(13): 3819-3833.
- Guo, J., Wang, S., Valerius, O., Hall, H., Zeng, Q., Li, J.-F., Weston, D.J., Ellis, B.E., and Chen, J.G.** (2011) Involvement of Arabidopsis RACK1 in Protein Translation and Its Regulation by Abscisic Acid. *Plant Physiology* **155**(1): 370-383.
- Hoad, G.V.** (1995) Transport of hormones in the phloem of higher plants. *Plant Growth Regulation* **16**(2): 173–182.
- Hoche, V., Sotta, B., Maldiney, R., and Miginiac, E.** (1991) Changes in abscisic acid and its  $\beta$ -D-glucopyranosyl ester levels during tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seed development. *Plant Cell Reports* **10**(9): 444-447.
- Hubbard, K.E., Nishimura, N., Hitomi, K., Getzoff, E.D., and Schroeder, J.I.** (2010) Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. *Genes and Development* **24**(16): 1695-1708.
- Islas-Flores, T., Guill 'ena, G., Ignacio Islas-Flores, I., Rom 'an-Roques, C.S., S 'ancheza, F., Loza-Taverac, H., Bearerd, E.L., and Villanueva, M.A.** (2009) Germination behavior, biochemical features and sequence analysis of the RACK1/arcA homolog from *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia Plantarum* **137**(3): 264-280.
- Iwasaki, Y., Komano, M., Ishikawa, A., Sasaki, T., and Asahi, T.** (1995) Molecular cloning and characterization of cDNA for a rice protein that contains seven repetitive segments of the Trp-Asp forty-amino-acid repeat (WD-40 repeat). *Plant and Cell Physiology* **36**(3): 505-510.

- Karszen, C.M., Brinkhorst Van der Swan, D.L.C., Breekland, A.E., and Koornneef, M.** (1983a). Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid- Studies on abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. *Planta* **157**(2): 158–165.
- Karszen, C.M., Zagórski, S., Kepczyński, J., and Groot, S.P.C.** (1983b). Key role for endogenous gibberellins in the control of seed germination. *Annals of Botany* **63**(1): 71-80.
- Kerk, D., Bulgrien, J., Smith, D.W., Barsam, B., Veretnik, S., and Gribskov, M.** (2002) The complement of protein phosphatase catalytic subunits encoded in the genome of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **129**(2): 908–925.
- Kerk, D.** (2006) Genome-scale discovery and characterization of class-specific protein sequences: an example using the protein phosphatases of *Arabidopsis thaliana*. *Methods in Molecular Biology* **365**: 347–370.
- Koornneef, M., and van der Veen, J.H.** (1980) Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Theoretical And Applied Genetics* **58**(6): 257–263.
- Koornneef, M., Reuling, G., and Karszen, C.M.** (1984) The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **61**(3): 377-383.
- Koornneef, M., Bentsink, L., and Hilhorst, H.** (2002) Seed dormancy and germination. *Current Opinion in Plant Biology* **5**(1): 33–36.
- Kucera, B., Cohn, M.A., and Leubner-Metzger, G.** (2005) Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research* **15**(4): 281–307.
- Kuhn, J.M., Boisson-Dernier, A., Dizon, M.B., Maktabi, M.H., and Schroeder, J.I.** (2006) The protein phosphatase *AtPP2CA* negatively regulates abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*, and effects of *abh1* on *AtPP2CA* mRNA. *Plant Physiology* **140**(1): 127-139.
- Lawson, T., James, W., and Weyers, J.** (1998) A surrogate measure of stomatal aperture. *Journal of Experimental Botany* **49**(325): 1397–1403.
- Leung, J., Bouvier-Durand, M., Morris, P.C., Guerrier, D., Chedfor, F., and Giraudat, J.** (1994) *Arabidopsis* ABA response gene *ABII*: features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science* **264**(5164): 1448-1452.
- Lewandowska, M., Borcz, B., Kamińska, J., Wawrzyński, A., and Sirko, A.** (2007) Polyadenylation and decay of 26S rRNA as part of *Nicotiana tabacum* response to cadmium. *Acta Biochimica Polonica* **54**(4): 747-755.
- Liu, P., Koizuka, N., Martin, R.C. and Nonogaki, H.** (2005) The BME3 (Blue Micropylar End 3) GATA zinc finger transcription factor is a positive regulator of

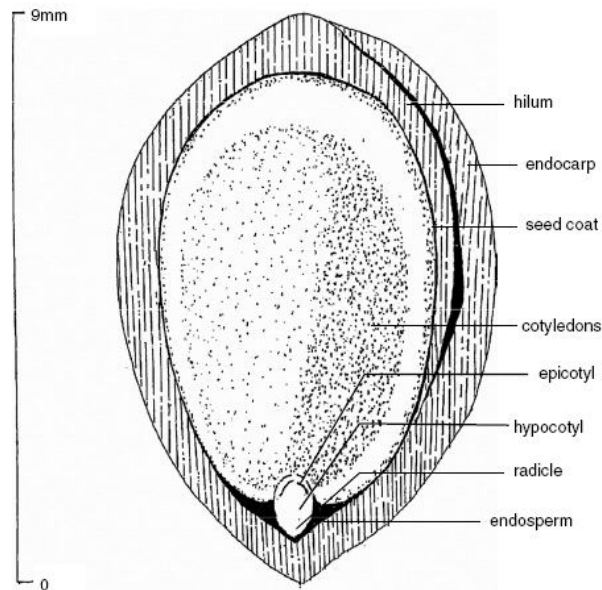


- Arabidopsis* seed germination. *Plant Journal* **44**(6): 960–971.
- Lopez-Molina, L., Mongrand, S., McLachlin, D.T., Chait, B.T., and Chua, N.H.** (2002) *ABI5* acts downstream of *ABI3* to execute an ABA dependent growth arrest during germination. *Plant Journal* **32**(3): 317–328.
- Lorenzo, O., Nicolás, C., Nicolás, G., and Rodríguez, D.** (2002) Molecular cloning of a functional protein phosphatase 2C (FsPP2C2) with unusual features and synergistically up-regulated by ABA and calcium in dormant seeds of *Fagus sylvatica*. *Physiologia Plantarum* **114**(3): 482-490.
- Melo, F. and Feytmans, E.** (1998) Assessing Protein Structures with a Non-local Atomic Interaction Energy. *Journal of Molecular Biology* **277**(5): 1141-1152.
- Meskiene, I., Bogre, L., Glaser, W., Balog, J., Brandstotter, M., Zwerger, K., Ammerer, G., and Hirt, H.** (1998) MP2C, a plant protein phosphatase 2C, functions as a negative regulator of mitogen-activated protein kinase pathways in yeast and plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **95**(4): 1938–1943.
- Meskiene, I., Baudouin, E., Schweighofer, A., Liwosz, A., Jonak, C., Rodriguez, P.L., Jelinek, H., and Hirt, H.** (2003) Stress-induced protein phosphatase 2C is a negative regulator of a mitogen-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* **278**(21): 18945-18952.
- Meyer, K., Leube, M.P., and Grill, E.** (1994) A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science* **264**(5164): 1452-1455.
- Nakashima, A., Chen, L., Thao, N.P., Fujiwara, M., Wong, H.L., Kuwano, M., Umemura, K., Shirasu, K., Kawasaki, T., and Shimamoto, K.** (2008) RACK1 Functions in Rice Innate Immunity by Interacting with the Rac1 Immune Complex. *The Plant Cell* **20**(8): 2265-2279.
- Okamoto, M., Kuwahara, A., Seo, M., Kushiro, T., Asami, T., Hirai, N., Kamiya, Y., Koshihata, T., and Nambara, E.** (2006) *CYP707A1* and *CYP707A2*, Which Encode Abscisic Acid 8-Hydroxylases, Are Indispensable for Proper Control of Seed Dormancy and Germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **141**(1): 97–107.
- Paiva, R., and de Oliveira, P.D.** (1995) The role of abscisic acid during seed precocious germination. *Fisiologia Vegetal* **7**(2): 175-179.
- Pressman, E., Negbi, M., Sachs, M., and Jacobsen, J.V.** (1977) Varietal Differences in Light Requirements for Germination of Celery (*Apium graveolens* L.) Seeds and the Effects of Thermal and Solute Stress. *Australian Journal of Plant Physiology* **4**(5): 821-831.
- Rao, V.S.** (2000) *Principles of Weed Science*, Second Edition. Science Publisher, Inc. p1-557.

- Reyes, D., Rodri'guez, D., Gonza'lez-Garci'a, M.P., Lorenzo, O., Nicola's, G., Garci'a-Marti'nez, J.L., and Nicola's, C.** (2006) Overexpression of a Protein Phosphatase 2C from Beech Seeds in Arabidopsis Shows Phenotypes Related to Abscisic Acid Responses and Gibberellin Biosynthesis. *Plant Physiology* **141**(4): 1414–1424.
- Rodriguez, P.L.** (1998) Protein phosphatase 2C (PP2C) function in higher plants. *Plant Molecular Biology* **38**(6): 919-927.
- Rubio, S., Rodrigues, A., Saez, A., Dizon, M.B., Alexander Galle, A., Tae-Houn Kim, T., Julia Santiago, J., Jaime Flexas, J., Julian I. Schroeder, J.I., and Pedro L. Rodriguez, P.L.** (2009) Triple Loss of Function of Protein Phosphatases Type 2C Leads to Partial Constitutive Response to Endogenous Abscisic Acid. *Plant Physiology* **150**(3): 1345-1355.
- Saez, A., Apostolova, N., Gonzalez-Guzman, M., Gonzalez-Garcia, M.P., Nicolas, C., Lorenzo, O., and Rodriguez, P.L.** (2004) Gain-of-function and loss-of-function phenotypes of the protein phosphatase 2C HAB1 reveal its role as a negative regulator of abscisic acid signalling. *Plant Journal* **37**(3): 354-369.
- Schweighofer, A., Hirt, H., and Meskiene, I.** (2004) Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends in Plant Science* **9**(5): 236-243.
- Schweighofer, A., and Meskiene, I.** (2008) Protein Phosphatases in Plant Growth Signalling Pathways. *Plant Cell Monographs* **10**: 277-297.
- Sheen J.** (1998) Mutational analysis of protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **95**(3): 975-980.
- Shimada, T.L., Shimada, T., and Hara-Nishimura, I.** (2010) A rapid and non-destructive screenable marker, FAST, for identifying transformed seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **61**(3): 519-528.
- Song, S.K., Lee, M.M., and Clark, S.E.** (2006) POL and PLL1 phosphatases are CLAVATA1 signaling intermediates required for Arabidopsis shoot and floral stem cells. *Development* **133**(23): 4691-4698.
- Sun, T.P., and Kamiya, Y.** (1994) The Arabidopsis *GAI* locus encodes the cyclase ent-kaurene synthetase A of gibberellin biosynthesis. *Plant Cell* **6**(10): 1509-1518.
- Sun, H., Wang, X., Ding, W., Zhu, S., Zhao, R., Zhang, Y., Xin, Q., Wang, X., and Zhang, D.** (2011) Identification of an important site for function of the type 2C protein phosphatase ABI2 in abscisic acid signalling in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **62**(15): 5713-5725.
- Ullah, H., Scappini, E.L., Moon, A.F., Williams, L.V., Armstrong, D.L., And Pedersen, L.C.** (2008) Structure of a signal transduction regulator, RACK1, from *Arabidopsis thaliana*. *Protein Science* **17**(10): 1771–1780.

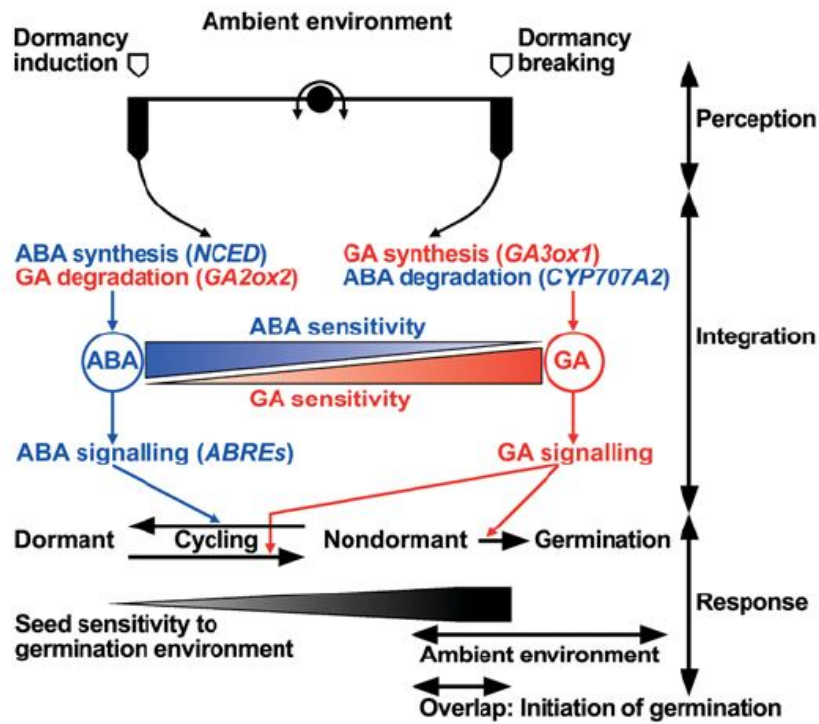
- Umezawa, T., Sugiyama, N., Mizoguchi, M., Hayashi, S., Myouga, F., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ishihama, Y., Hirayama, T., and Shinozaki, K.** (2009) Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **106**(41): 17588-17593.
- Vlad, F., Rubio, S., Rodrigues, A., Sirichandra, C., Belin, C., Robert, N., Leung, J., Rodriguez, P.L., Laurière, C., and Merlot, S.** (2009) Protein phosphatases 2C regulate the activation of the Snf1-related kinase OST1 by abscisic acid in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**(10): 3170-3184.
- Wera, S., and Hemmings, B.A.** (1995) Serine/threonine protein phosphatases. *Biochemical Journal* **311**(1): 17-29.
- Wu, Y., Sanchez, J.P., Lopez-Molina, L., Himmelbach, A., Grill, E., and Chua, N.H.** (2003) The *abil-1* mutation blocks ABA signaling downstream of cADPR action. *Plant Journal* **34**(3): 307–315.
- Yamauchi, Y., Ogawa, M., Kuwahara, A., Hanada, A., Kamiya, Y., and Yamaguchi, S.** (2004) Activation of gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Cell* **16**(2): 367-378.
- Yoshida, R., Umezawa, T., Mizoguchi, T., Takahashi, S., Takahashi, F., and Shinozaki, K.** (2006) The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* **281**(8): 5310-5318.
- Yoshida, T., Nishimura, N., Kitahata, N., Kuromori, T., Ito, T., Asami, T., Shinozaki, K., and Hirayama, T.** (2006) *ABA-hypersensitive germination3* encodes a protein phosphatase 2C (AtPP2CA) that strongly regulates abscisic acid signaling during germination among Arabidopsis protein phosphatase 2Cs. *Plant Physiology* **140**(1): 115-126.
- Yu, L.P., Simon, E.J., Trotochaud, A.E., and Clark, S.E.** (2000) *POLTERGEIST* functions to regulate meristem development downstream of the *CLAVATA* loci. *Development* **127**(8): 1661–1670.
- Yu, L.P., Miller, A.K., and Clark, S.E.** (2003) *POLTERGEIST* encodes a protein phosphatase 2C that regulates CLAVATA pathways controlling stem cell identity at Arabidopsis shoot and flower meristems. *Current Biology* **13**(3): 179–188.
- Zeng, Y., Raimondi, N., and Kermode, A.R.** (2003) Role of an ABI3 homologue in dormancy maintenance of yellow-cedar seeds and in the activation of storage protein and Em gene promoters. *Plant Molecular Biology* **51**(1): 39–49.

## 附錄



### **Appendix 1. Seeds of Formosan cherry (*Prunus campanulata*).**

山櫻花的種子結構，主要由堅硬的內果皮(endocarp)、種皮、胚乳和胚所構成 (Chen *et al.*, 2007)。



## Appendix 2. 不同環境條件下ABA與GA調控種子休眠與發芽之模式圖

種子休眠時ABA的合成與訊息傳導較佔優勢，即將發芽時則是GA的合成與訊息傳導佔優勢。變動的環境因子(例如溫度)影響了ABA和GA的平衡，造成種子內荷爾蒙之合成、分解與敏感度的變化，進而導致了休眠的深淺循環。種子休眠深度的變化影響了發芽需求的條件，使種子更容易或不容易發芽。

Model based on work with *A. thaliana* ecotype Cvi, modified from Cadman *et al.*, 2006 (Finch-Savage *et al.*, 2006).

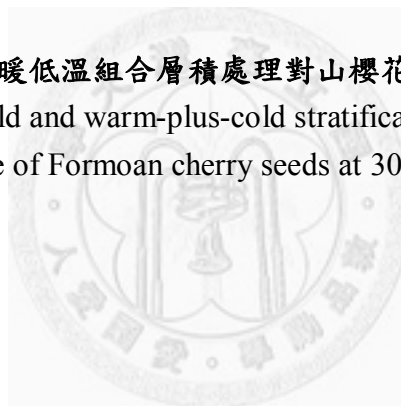
Warm stratification at 30/20°C	Cold stratification at 4°C <sup>1</sup>			
	0 weeks	4 weeks	8 weeks	12 weeks
0 weeks	0	22.7 <sup>e</sup> (40.8) <sup>2</sup>	70.0 <sup>c</sup> (13.3)	88.3 <sup>b</sup> (8.4)
4 weeks	1.3 <sup>f</sup>	34.7 <sup>d</sup> (16.5)	98.7 <sup>a</sup> (7.8)	98.8 <sup>a</sup> (7.0)
6 weeks	2.7 <sup>f</sup>	— <sup>3</sup>	98.7 <sup>a</sup> (7.4)	97.3 <sup>a</sup> (7.7)

<sup>1</sup> Means (n=3) with the same letter do not differ significantly (LSD,  $\alpha = 0.05$ ).

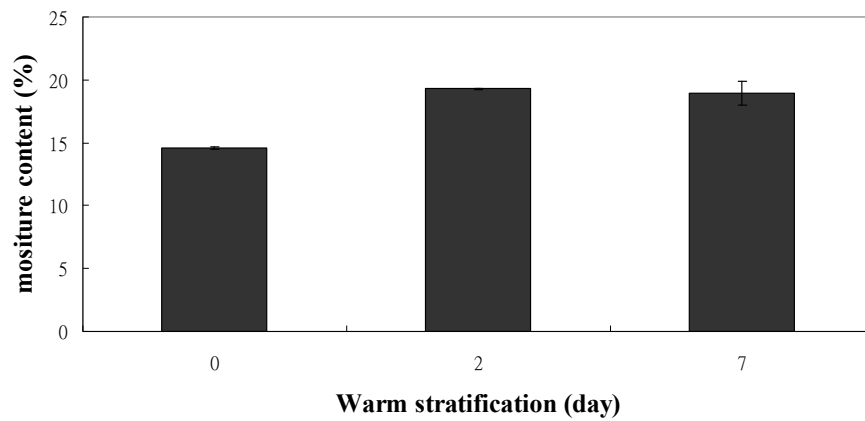
<sup>2</sup> Values in parentheses are mean germination time (MGT) in days.

<sup>3</sup> —, Not tested.

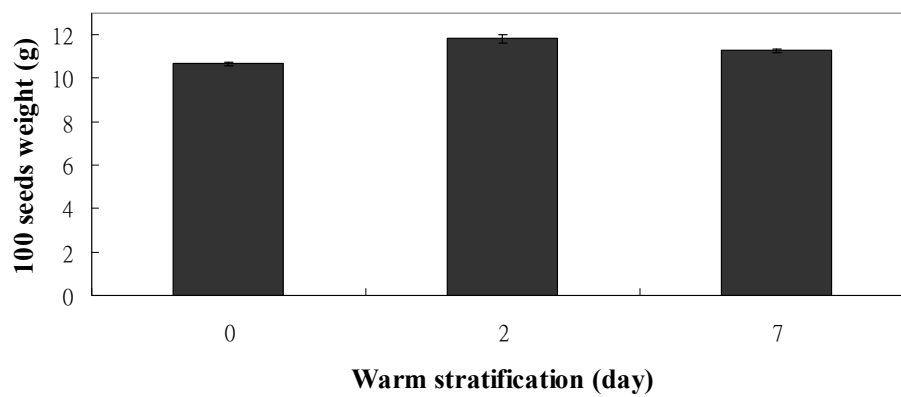
**Appendix 3. 低溫層積和暖低溫組合層積處理對山櫻花種子發芽率和平均發芽天數的影響。** Effect of cold and warm-plus-cold stratification on percent germination and mean germination time of Formosan cherry seeds at 30/20 °C (Chen *et al.*, 2007).



**A**

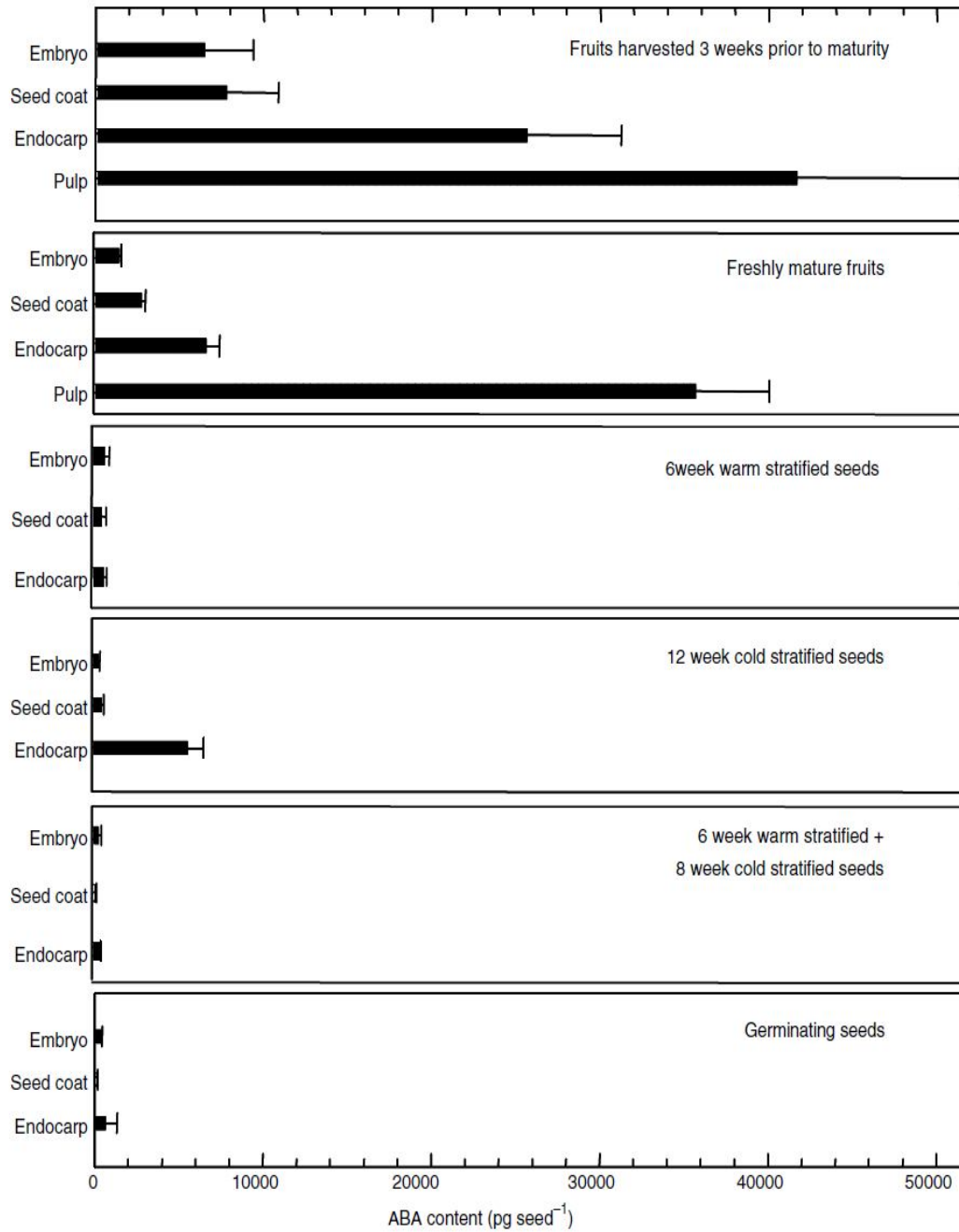


**B**



**Appendix 4. 暖溫層積對山櫻花種子含水量與平均重量的影響。**

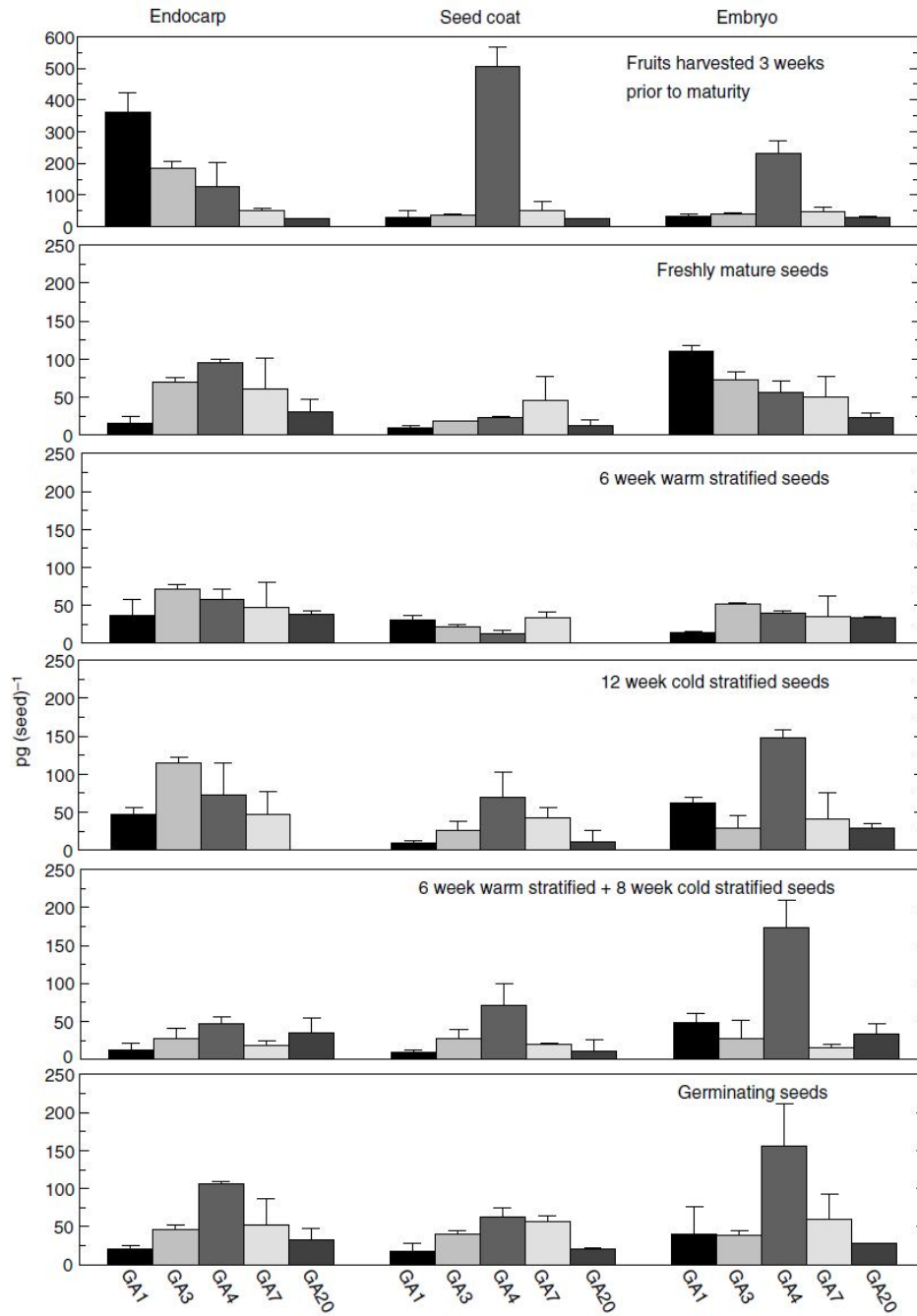
Moisture content and 100-seed weight of Formosan cherry seeds. (A) Moisture content was determined for both non-stratified seeds and stratified seeds using three replicates of 20 seeds each, and calculated on a fresh weight basis after oven drying for 24 h at 80°C. Results are presented as means  $\pm$  SD from 3 replicates of 20 seeds each. (B) 100-seed weight of Formosan cherry seeds. Results are presented as means  $\pm$  SD from 3 replicates of 100 seeds each (魯, 2011).



**Appendix 5. 新鮮或層積處理後山櫻花種子內各部位的 ABA 含量**

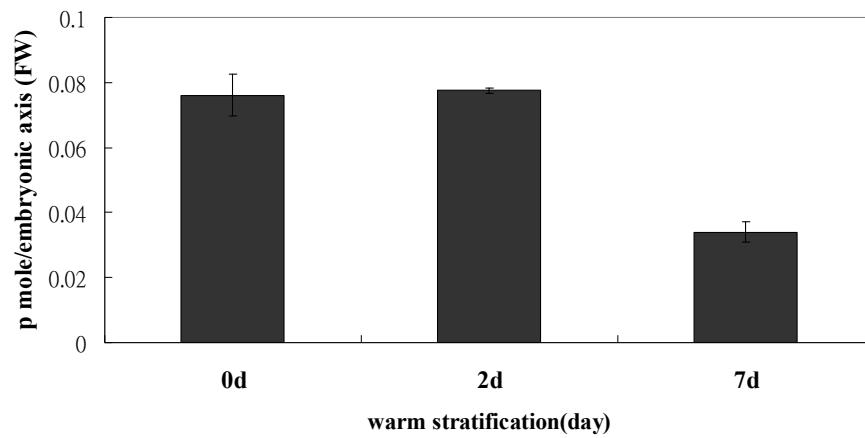
Abscisic acid content of the various seed parts from fresh or from moist stratified Formosan cherry seeds. Results are presented as means  $\pm$  SD from two replicates of 50 seeds each (Chen *et al.*, 2007).





**Appendix 6. 新鮮或層積處理後山櫻花種子內各部位的 GAs 含量**

Gibberellic acid contents of the various seed parts from fresh or from moist stratified Formosan cherry seeds. Results are presented as means  $\pm$  SD from two replicates of 50 seeds each (Chen *et al.*, 2007).



**Appendix 7. 無處理與暖溫層積處理之山櫻花種胚的ABA含量**

Results are presented as means  $\pm$  SD from three replicates of 50 seeds each (魯, 2011).

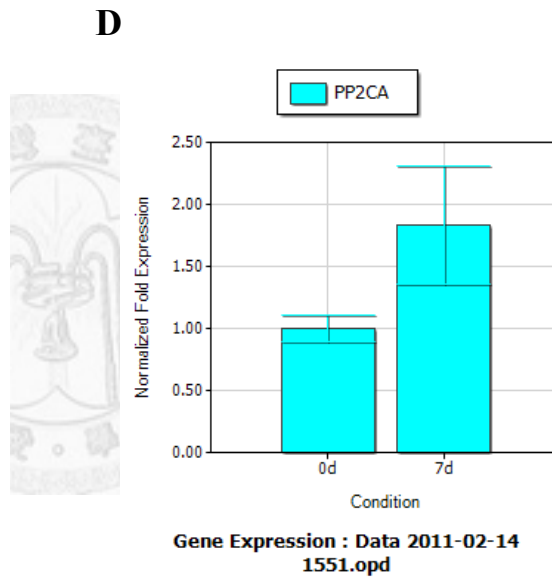
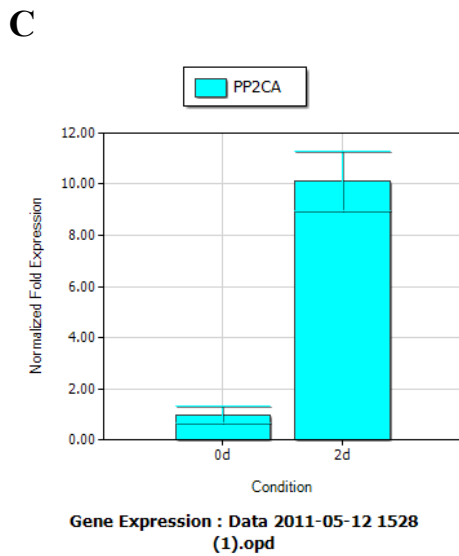
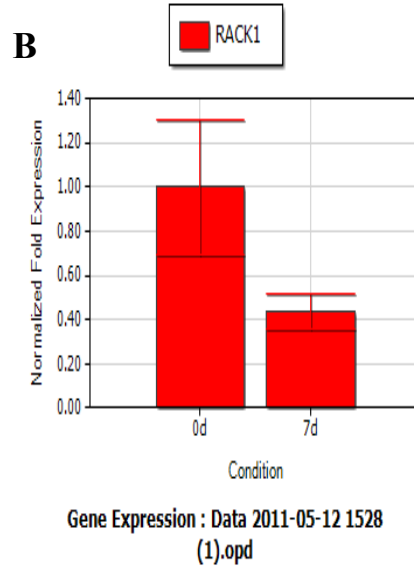
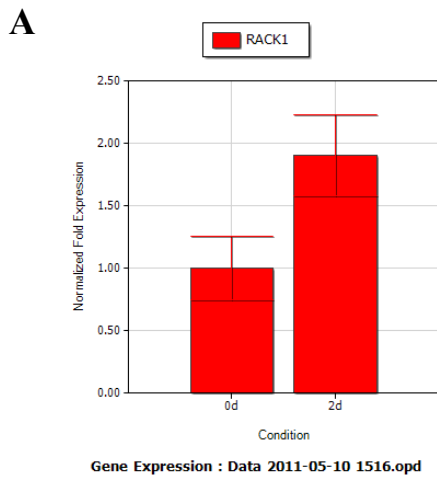


Function category	Clones	size(bp)	putative homologous protein	accession	identities	species
Environmental Information Processing Signal Transduction	#154	248	RACK1B_AT (receptor for activated C kinase 1 B)	NP_175296	60/69 (87 %)	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Environmental Information Processing; Signal Transduction	#54	586	PP2CA (Arabidopsis thaliana protein phosphatase 2CA)	NP_187748	138/204 (68 %)	<i>Arabidopsis thaliana</i>

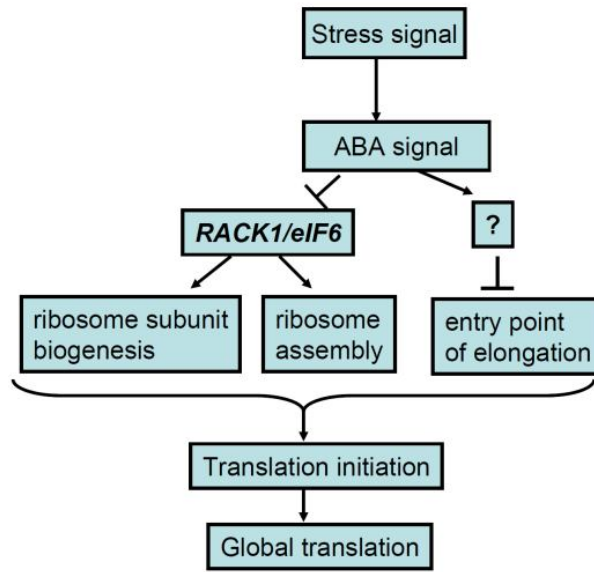
**Appendix 8. *PcRACK1* 和 *PcPP2CA* 為暖溫層積處理後山櫻花種胚中表現量提升的基因**

山櫻花新鮮種子暖溫層積處理後表現量上升的兩個基因(魯, 2011)。



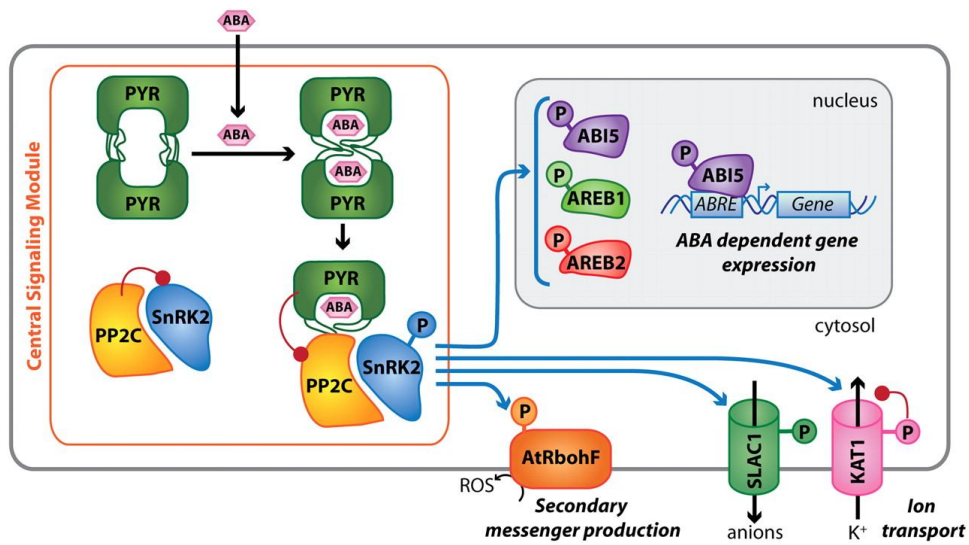


**Appendix 9. 新鮮或暖溫層積之山櫻花種胚中 *RACK1B* 和 *PP2CA* 的相對表現量**  
 (A) The expression pattern of *RACK1B* after 2-day warm stratification measured by real-time PCR. (B) The expression pattern of *RACK1B* after 7-day warm stratification. (C) The expression pattern of *PP2CA* after 2-day warm stratification. (D) The expression pattern of *PP2CA* after 7-day warm stratification. The quantitative control is *26S rRNA*. Shown are the mean values of three biological replicates  $\pm$ SE (魯, 2011).



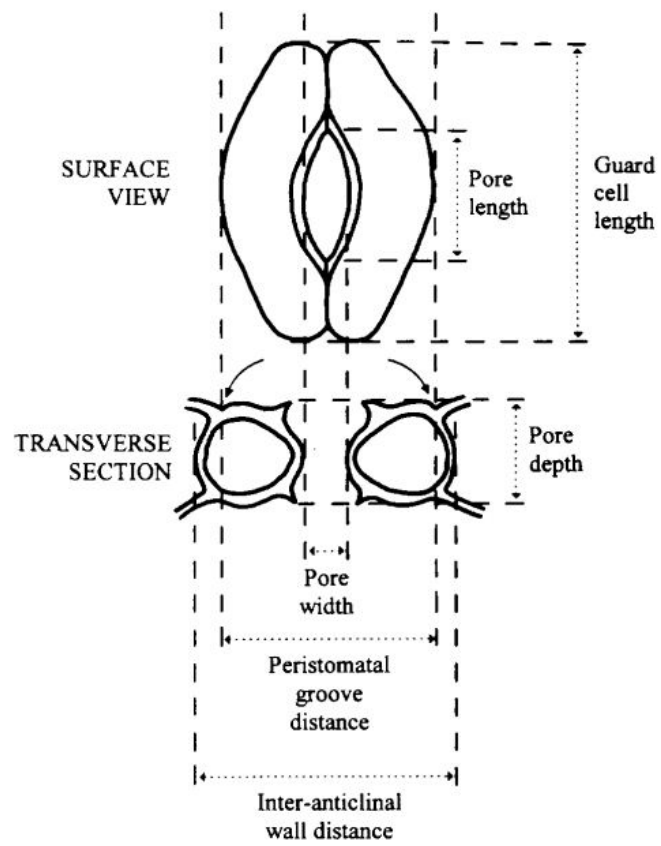
**Appendix 10. 阿拉伯芥 *RACK1* 之作用模式圖**

ABA 抑制 *RACK1* 與轉譯起始因子 *eIF6* 的交互作用，使核糖體的組裝受到阻礙，從而抑制了種子萌發所需蛋白質的轉譯，達到抑制萌芽的目的(Guo *et al.*, 2011)。



### Appendix 11. PYR/RCAR-PP2C-SnRK2 之訊息傳導模式圖

當 ABA 含量很低時，PP2C 藉由抑制蛋白磷酸酶(SnRK2)自我磷酸化而抑制其活性。而當 ABA 存在時，ABA 和細胞內的 ABA receptor PYR/PYL dimer 形成複合體，此複合體會和 PP2C 結合而抑制 PP2C 的功能，而使 SnRK2 得以活化，活化的 SnRK2 就能磷酸化 ABA 路徑的轉譯因子和相關的離子通道與二級信使蛋白，啟動 ABA 相關的基因表現(Hubbard *et al.*, 2010)。



### Appendix 12. 植物氣孔圖解

上、下圖分別顯示一對保衛細胞的平面與橫切面(Lawson *et al.*, 1998)。

### Appendix 13. Primers

---

#### *PcRACK1* 所用引子

---

RACK1B-F	GCCGAGGTA ACTTGACCAAC
RACK1B-R	TAGCACCAGCACCAAGTGAG
PcRackF1	GGTCGCGGCCGAGGTA ACTTGACCA
PcRackF2	CGCCAGCGGAGGGAAAGATGGAGTGA
PcRackF3	ACCATGCGTGCCCACACTGA
PcRackR1	GGGACTGAAGCAGAGAGCGTGGATA
PcRackR2	GCCAAATCCCACAGCAAATCACTCCA
PcRackR3	CCTAAATAAACTTTAATGCAACTACAAGAAC
RACK1_5F	ATTTTTCTCTCACGCTTTCCTC
RACK1_3R	CAAATAACGAGGCCTCAAAGC

---

---

#### *PcPP2CA* 所用引子

---

PP2CA-R	CAACCACCTCCTTGTCATT
PP2CA-F	CGTCGGGAAATTGCATTACT
<i>PcPP2CA</i> -R1	CTTGACATGGCGAGA ACTCCGAGCAC
<i>PcPP2CA</i> -R2	CCTTCGCTCCACGCAACCACCTCCT
<i>PcPP2CA</i> -R3	CTCCAGTTCGTCTCTCACCA
<i>PcPP2CA</i> -R4	GCTCATCATGACCATTACCATTGC
<i>PcPP2CA</i> -F1	TGTGGAAGACGACGAGATATGGAGGA
<i>PcPP2CA</i> -F2	GGAGGTGGTTGCGTGGAGCGAAGGT
<i>PcPP2CA</i> -F3	GGCGGAGGACGAGTGTTTGA
PP2C_5F	CCCTTACATCTTCCTGTTTCAATTA
PP2C_3R	AAA ACTCCAAACCTTTTTTTTTTATAGCTT

---

---

#### 其他引子

---

26S rRNA-F	AACCTGTCTCACGACGGTCT
26S rRNA-R	CGTGGCCTATCGATCCTTTA
Pc_actin F	TGTGCCTGCCATGTATGTTGC
Pc_actin R	GTCTCATGAATTCCAGCAGCTTCCA

---



## Appendix 14. Vectors

