

國立臺灣大學生物資源暨農學院農藝學系



碩士論文

Department of Agronomy  
College of Bioresources and Agriculture  
National Taiwan University  
Master Thesis

水稻蔗糖轉運蛋白基因 *OsSUT4* 受刻傷

誘導表現之調控機制

Regulation of mechanical wounding induced expression of  
sucrose transporter gene *OsSUT4*

戴 乃 強

Nai-Chiang Dai

指導教授：王淑珍 博士

Advisor: Shu-Jen Wang, Ph.D.

中華民國 102 年 7 月

July, 2013

## 誌謝



首先要感謝我的父母，可以穩定的幫助我不管是生活上或是精神幫助，讓我在這碩士班的日子裡可以更專注的在研究上面。

在這些日子裡，非常感謝我的碩士班指導老師王淑珍老師，從大學畢業後，由完全不了解學術研究，到現在可以做一個全面的思考並且找出試驗的問題所在，能在實驗上可以有獨當一面。另外也感謝老師在做人處事態度上的分享、日常生活的關心和在實驗低潮的時候的鼓勵，讓我可以順利的完成碩士學位。


感謝學長姐：宗孟、雲洋、懷如、惠心、鍾萍、蕭蔚和祥霖，在實驗上當我有問題時，可以給我許多意見和經驗的分享，讓我實驗問題可很快解決並順利的進行。

碩士班酸甜苦辣的日子裡，感謝實驗室跟我奮鬥的夥伴們，謝謝佳瑋在許多時後可以幫助我收材料和實驗上的協助；感謝柏均在每次專討可以幫我修定英文上嚴重的錯誤；感謝毓安在我實驗忙碌時幫我外帶飲料和餐點；也感謝薌雯能在實驗上給我意見和能力的肯定，由於大家的協助讓我可以順利的拿到學位。也謝謝新來的學弟妹們：靖雯、璿如、恪玄和士廷，在我忙於論文的時候能幫我處理實驗的瑣事。

論文上，非常感謝各口試委員老師在論文上的指教和未來許多的實驗方向的建議，也謝謝台大農化系洪傳揚老師在轉殖實驗的指導，也感謝台大昆蟲系楊恩誠老師、中興昆蟲系戴淑美老師提供我試驗中的協助和諮詢，還有也謝謝農業試驗所賴明信博士在水稻種子上的提供，得以讓我順利進行實驗並完成這本論文。

最後一定要謝謝曾經替我加油、打氣和給我正面想法的同學們，讓我曾經在最低迷並一度想放棄這學位的時候，因為有了大家這麼的一句鼓勵讓我可以重拾信心回到正軌上繼續完成學業。

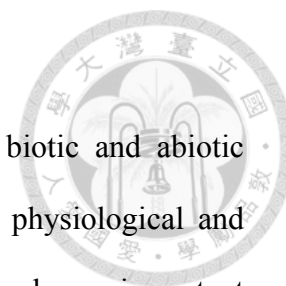
## 中文摘要



植物生長過程中會遭受到許多的生物和非生物造成之刻傷逆境。當植物遇刻傷逆境時將會調整其生理及代謝反應以進行修補及防禦反應。糖類分子於刻傷逆境反應中具有提供修補所需碳源及能量之功能。水稻蔗糖轉運蛋白(sucrose transporter, SUT)家族基因中之 *OsSUT4* 的表現量會受到機械性傷害和斜紋夜盜蟲(*Spodoptera litura*)的咬食之刺激而明顯增強。在機械性傷害處理之葉部，與蔗糖代謝相關之蔗糖水解酵素(*OsCIN1*)及單糖轉運蛋白(*OsMST6*)之表現也會受到刻傷逆境誘導。然而當水稻莖稈受到褐飛蟲(*Nilaparvata lugens*)刺吸後 *OsSUT4* 的基因表現卻會受到抑制。進一步之試驗結果顯示，機械性刻傷處理後，茉莉酸(JA)和乙烯生合成相關基因均有增加之現象，且此二種荷爾蒙均可促進 *OsSUT4* 基因表現，另以茉莉酸合成抑制劑處理水稻植株將會降低機械性刻傷誘導 *OsSUT4* 基因表現之反應。此外，刻傷處理將誘導  $H_2O_2$  累積，且  $H_2O_2$  具增強刻傷刺激誘導 *OsSUT4* 基因表現之功能。進而，藉由 *OsSUT4* 之不同長度的啟動子接上 GUS 報導基因之水稻轉殖株分析，發現調控 *OsSUT4* 受機械性刻傷誘導表現之啟動子調控序列位於轉譯起始點至其上游 248 個核苷酸序列間。

**關鍵字:**機械傷害、水稻、蔗糖轉運蛋白、啟動子

## Abstract



Plants are often suffered by wounding stresses caused by biotic and abiotic factors during growth and development, and they will modulate physiological and metabolic behavior to process repair and defense responses. Sugars play an important role to provide carbon and energy source for healing at wound site. The expression of *OsSUT4* gene, one of rice sucrose transporter family member, was significantly enhanced by mechanical wounding and *Spodoptera litura* chewing stimuli. However, when rice plants was attacked by sap-sucking pest, i.e. *Nilaparvata lugens*, *OsSUT4* gene expression in rice culm was down-regulated. In addition to *OsSUT4* expression, the transcript levels of the cell wall invertase gene (*OsCINI*) and monosaccharide transporter gene (*OsMST6*) were also increased in mechanical wounding-treated rice plants. Expression of *OsSUT4* can be promoted by exogenous jasmonate (JA) and ethylene. Furthermore, if JA biosynthesis pathway was blocked, the wound-induced *OsSUT4* expression would be repressed. In addition, since NADPH oxidase inhibitor treatment can reduce the wounding effect on *OsSUT4* expression, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was considered to function as a signal factor involved to the regulatory pathway of wound-regulated *OsSUT4* expression. According to *OsSUT4* promoter activity analysis in transgenic rice plants, it was suggested that the wounding-responsive element on *OsSUT4* promoter was located at the region within 248 bp upstream of the translation start codon.

**Key words:** Mechanical wounding, promoter, rice (*Oryza sativa* L.), sucrose transporter

# 目錄



誌謝.....	i
中文摘要.....	ii
Abstract.....	iii
目錄.....	iv
圖目錄.....	vii
附表及附圖目錄.....	viii
縮寫字對照.....	ix
一、前言.....	1
1.機械性傷害逆境對碳水化合物轉運影響.....	1
2.糖類分子於植物刻傷反應中的角色和功能.....	2
3.水稻的蔗糖轉運蛋白研究.....	2
4.糖類相關轉運蛋白及代謝相關基因受機械性傷害逆境的影響.....	4
5.植物受機械性傷害和昆蟲咬食所引起之異同.....	5
6.刻傷逆境的訊息傳導因子.....	5
7.本論文研究主題.....	7
二、材料與方法.....	8
1.植物材料.....	8
2.種子消毒和植株培養.....	8
3.水稻機械性傷害處理.....	8
4.三葉齡水稻幼苗斜紋夜盜蟲餵養處理.....	8
5.三葉齡水稻幼苗的褐飛蝨餵養處理.....	9
6.水稻植株內生糖含量測定.....	9
6.1 測定材料.....	9
6.2 水稻葉身可溶性糖含量測定.....	9

7.MeJA、SA、ABA、ET 荷爾蒙藥劑處理.....	10
8.荷爾蒙、過氧化氫生合成抑制劑前處理.....	10
9.過氧化氫定性及定量測定.....	11
9.1 刻傷逆境下過氧化氫(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )定性觀察.....	11
9.2 刻傷逆境下過氧化氫(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )定量測定.....	11
10. 穩定性表現系統進行啟動子活性分析.....	11
10.1 <i>OsSUT4</i> 基因啟動子- <i>GUS</i> 轉殖水稻 <i>POsSUT4</i> .....	11
10.2 構築水稻蔗糖轉運蛋白 <i>OsSUT4</i> 基因啟動子穩定性表現載體.....	11
10.3 EHA105 農桿菌勝任細胞的製備.....	12
10.4 EHA105 農桿菌轉型.....	12
10.5 水稻癒傷組織的誘導.....	15
10.6 水稻農桿菌轉殖.....	13
10.7 轉殖水稻 <i>GUS</i> 活性之組織化學染色分析.....	14
11. 基因表現分析.....	14
11.1 水稻總 RNA 萃取.....	14
11.2 TURBO DNase 處理.....	15
11.3 RNA 電泳.....	15
11.4 即時反轉錄聚合酶連鎖反應(real-time RT-PCR).....	16
三、結果.....	17
1. 機械性傷害對 <i>OsSUT4</i> 、 <i>OsCINI</i> 及水稻單糖轉運蛋白 <i>OsMST6</i> 基因表現影響.....	17
2. 斜紋夜盜蟲對水稻蔗糖轉運蛋白的影響.....	17
3. 褐飛蝨對水稻蔗糖轉運蛋白的影響.....	17
4. 水稻內生糖含量對於刻傷逆境誘導 <i>OsSUT4</i> 基因表現影響.....	18
5. 探討荷爾蒙是否參與機械性傷害誘導 <i>OsSUT4</i> 表現的調控機制.....	18
5.1 MeJA 相關探討.....	18

5.2 SA 相關探討.....	18
5.3 ABA 相關探討.....	19
5.4 乙烯相關探討.....	19
6. 過氧化氫(Hydrogen peroxide)在刻傷逆境中對 <i>OsSUT4</i> 基因表現的影響...	20
7. 受刻傷逆境 <i>OsSUT4</i> 基因啟動子之活性探討.....	20
四、討論.....	22
1. <i>OsSUT4</i> 在植物受機械性傷害反應中可能扮演的角色.....	22
2. 醣分子對於刻傷誘導 <i>OsSUT4</i> 表現的探討.....	22
3. 機械性傷害、斜紋夜盜蟲和褐飛蝨對 SUT 影響的探討.....	23
4. 刻傷逆境下各荷爾蒙對 <i>OsSUT4</i> 表現的探討.....	24
5. 刻傷逆境下 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 對 <i>OsSUT4</i> 基因表現的影響探討.....	25
6. 受到刻傷逆境調控的 <i>OsSUT4</i> 啟動子區域探討.....	26
7. 結語及未來展望.....	27
五、參考文獻.....	51

## 圖目錄



圖一、水稻三葉齡幼苗第三片葉受機械性刻傷後 <i>OsSUT4</i> 、 <i>OsCINI</i> 及 <i>OsMST6</i> 基因表現分析.....	28
圖二、水稻三葉齡幼苗受到機械性刻傷和夜盜蟲餵食處理之 <i>OsSUT4</i> 基因表現之比較分析.....	29
圖三、水稻三葉齡幼苗莖部經褐飛蟲餵食處理後 <i>OsSUT1</i> 、 <i>OsSUT2</i> 及 <i>OsSUT4</i> 基因之個別表現分析.....	30
圖四、三葉齡水稻幼苗黑暗 48 小時總糖含量變化及黑暗 48 小時受到刻傷處理 30 分鐘後的 <i>OsSUT4</i> 基因表現.....	31
圖五、刻傷處理對 Jasmonate 生合成路徑基因表現、MeJA 對 <i>OsSUT4</i> 的基因和 Aspirin 前處理對刻傷誘導 <i>OsSUT4</i> 基因表現影響.....	32
圖六、SA 對於 <i>OsSUT4</i> 的影響.....	33
圖七、刻傷處理對 ABA 生合成路徑和反應基因的表現、ABA 對 <i>OsSUT4</i> 的基因影響和抑制劑前處理對刻傷誘導 <i>OsSUT4</i> 基因表現影響.....	34
圖八、刻傷對乙烯生合成路徑和乙烯反應基因表現、Ethephon 對 <i>OsSUT4</i> 的基因影響和前處理乙烯生合成抑制劑對誘導 <i>OsSUT4</i> 基因表現影響.....	36
圖九、三葉齡水稻幼苗受刻傷時過氧化氫定性和定量及外加 NADPH oxidase 產生 $H_2O_2$ 抑制劑-DPI 在刻傷逆境後 $H_2O_2$ 定量及 <i>OsSUT4</i> 基因表現情形.....	38
圖十、三葉齡水稻幼苗尖端(Tip)及基部端(Base)刻傷處理 <i>OsSUT4</i> 基因表現量差異,及不同片段不同 Line No.尖端和基部 GUS 基因表現.....	39
圖十一、 <i>OsSUT4</i> 啟動子 5'-deletion 片段 <i>GUS</i> 基因受刻傷誘導表現分析.....	40
圖十二、刻傷逆境調控 <i>OsSUT4</i> 基因表現示意圖.....	41



## 附表及附圖目錄



附表一、構築 <i>OsSUT4</i> 基因不同長度啟動子的引子列表.....	42
附表二、real-time RT-PCR 之專一性引子.....	43
附表三、木村氏水耕液配方.....	45
附表四、水稻轉殖相關培養基.....	46
附圖一、穩定性表現系統構築所使用的載體.....	48
附圖二、 <i>OsSUT4</i> 啟動子上受刻傷、ABA、JA、SA 調控的 <i>cis</i> -acting element.....	49
附圖三、轉植株水稻啟動子活性分析刻傷處理示意圖.....	50

## 縮寫字對照



簡 寫	全 名
ABA	Abscisic acid
ACC	1-aminocyclopropane-carboxylic acid
ACO	ACC oxidase
ACS	ACC synthase
AOC	Allene oxide cyclase
AOS	Allene oxide synthase
Asp	Aspirin
BA2H	Benzoic acid 2-hydroxylase
CIN	Cell wall invertase
DEPC	Diethyl pyrophosphate
DPI	Diphenyliodonium chloride
EDTA	Ethylene diamine tetra acetic acid
ET	Ethephon
Flu	Fluridon
GA	Gibberellin
GUS	$\beta$ -glucuronidase
HPLs	Hydroperoxide lyase
Ibu	Ibuprofen
JA	Jasmonate
JAR1	JASMONATE RESISTANT1
LOX	Lipoxygenase
MeJA	Methyl jasmonate
MOPS	3-[N-Morpholino] propanesulfonic acid
MST	Monosaccharide transporter
NCED	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase
NO	Nitric acid
OsSUT	<i>Oryza sativa</i> Sucrose transporter



簡 寫	全 名
PR	Pathogenesis-related
SA	Salicylic acid
Ubi	Ubiquitin
X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-D-galactopyranoside

## 前言

植物生長過程中，常遭受到不同程度之刻傷逆境，引起植物機械性刻傷的因子包含強風、暴雨、冰雹、飛砂及磨擦等非生物所引起的機械性傷害，另外由生物性引起的像是植食性昆蟲及動物取食行為，還有人為的嫁接、扦插及採收行為均會造成機械性傷害的逆境。刻傷不僅會造成植物組織受損，亦易造成植物水分喪失，病原菌的入侵，進而造成作物產量及品質下降。植物受到刻傷逆境後會引起許多的生理及代謝反應的改變，由 microarray 分析結果顯示機械性傷害會誘導許多修復或是防禦機制相關的基因表現(Reymond et al., 2000)，例如在植物受到刻傷 24 小時後，可觀察到阿拉伯芥的葉片中會產生酚類化合物的累積，其可做為合成下游相關木質素物質生合成的前驅物，以減少傷口對外界的接觸(Delessert et al., 2004)。

### 1. 機械性傷害逆境對碳水化合物轉運的影響

植物受到逆境時會改變其內生糖類於組織間之轉運及分配。以菸草為例，以放射性同位素  $^{14}\text{C}$  追蹤植物內碳水化合物的流向，並模擬草食昆蟲咬食葉片之行為，發現會促進碳源由地上部轉運到地下部，而後植物會再將地下部存放的碳源再轉運至地上部並進行重新分配(Schwachtje et al., 2006)。另外在阿拉伯芥的研究中發現，於葉片刻傷之傷口周圍，其光合作用的光系統 II 的效率會下降，而離傷口較遠處則上升，並以  $^{14}\text{C}$  標定  $\text{CO}_2$  觀察碳轉運的流向之研究結果發現傷口周圍成為一強烈的 sink 組織，其有較多放射性物質累積(Quilliam et al., 2006)。此外在植物荷爾蒙中茉莉酸(Jasmonate)為一受刻傷逆境誘導表現的荷爾蒙(Abraham and Gregg 2009)，在白楊樹的實驗中以外加甲基茉莉酸(Methyl jasmonate; MeJA)模擬刻傷逆境，發現 MeJA 處理組會有較高的碳源輸入(Arnold and Schultz 2002)。於菸草中發現在處理甲基茉莉酸 MeJA 後會促進二次代謝物草莽酸代謝途徑(Shikimate pathway)的進行，並增加下游肉桂酸(Cinnamic acid)含量，最後增加下游相關木質素的生合成(Hanik et al., 2010)。在甜菜中，根部受

到機械性傷害後，在受傷部位的葡萄糖、果糖和蔗糖都會隨時間而增高，並且也伴隨著呼吸作用的上升(Rosenkranz et al., 2001)。

## 2. 糖類分子於植物刻傷反應中的角色和功能

糖分子不僅僅可作為能量和碳骨架的來源，也可扮演一個訊息因子的角色(Smeekens et al., 2010)，其可調控部分刻傷反應相關基因的表現。先前研究顯示，馬鈴薯的 protease inhibitor II (Pin II) 會受到機械性傷害和昆蟲的誘導，其表現也會被 JA 和外加糖類而有誘導並增強的表現(Johnson and Ryan, 1990; Kim et al., 1991)。同樣的 Pathogenesis-related (PR) 和 LOX 基因也會受到糖的誘導(Sadka et al., 1994)。

## 3. 水稻的蔗糖轉運蛋白研究

蔗糖於細胞間的運輸可經由原生質連絡絲(plasmodesmata)亦可經由蔗糖轉運蛋白(Sucrose transporter, SUT)進出細胞。高等植物中碳水化合物於組織及器官間的轉運最主要以蔗糖(sucrose)為主要的糖類運輸型式，蔗糖可透由位於韌皮部上的蔗糖轉運蛋白將蔗糖以主動運輸形式轉運到韌皮部以進行長距離的運輸(Braun and Slewinski, 2009)。由菸草和番茄的 *NtSUT1* 及 *StSUT1* 研究中發現，當以反義股 RNA 轉殖降低其表現量，在這些轉植株中可看到葉片中有較高的可溶性糖的累積、開花延後、果實及種子發育不良的現象(Bürkle et al., 1998; Hackel et al., 2006)，因此蔗糖轉運蛋白在 sink 組織和 source 組織的關係維持中扮演著重要角色。

SUT 基因在大多數植物體中屬於多基因之基因家族，而其蛋白質結構，為一個有 12 個穿膜區間的膜蛋白(Shiratake 2007)，而根據目前蔗糖轉運蛋白的氨基酸序列可以分成三種形式(Aoki et al., 2003)，Type I 特性為 high-affinity/low-capacity，Type II 在蛋白質的結構上有較長的 N 端及長的中心圈環，其與酵母菌的蔗糖感應蛋白(sensor)結構相似，因此推測可能和蔗糖的感應有關(Barker et al., 2000)。而 Type III 特性為 low-affinity/high-capacity。

水稻中有五個蔗糖轉運蛋白基因(*OsSUT1~OsSUT5*)(Aoki et al., 2003)，根據胺基酸分類 *OsSUT1*、3、4 和 5 歸屬於 TypeII，而 *OsSUT2* 屬於 TypeIII(Aoki et al., 2012)。第一個被篩選出的水稻 SUT 基因為 *OsSUT1*，基因表現在水稻的葉身、葉鞘、穗和發芽中的種子中均有表現，而在根部中則沒有表現 (Hirose et al., 1997)，在花序組織中，*OsSUT1* 的基因表現會隨著開花後而逐漸上升，在第七天後隨之而下降(Aoki et al., 2003)。另外本實驗室先前的研究指出在種子浸潤期間，*OsSUT1* 基因於胚部組織之表現會迅速上升，而後下降，另在葡萄糖和蔗糖處理 24 小時後，*OsSUT1* 基因表現被抑制，但在處理後五天 *OsSUT1* 的表現則明顯上升，且葡萄糖調控 *OsSUT1* 基因的表現是經由 hexokinase-dependent signal transduction pathway(Chen et al., 2010)。在水稻種子的胚部組織中 *OsSUT1* 表現亦受荷爾蒙 gibberellinic acid (GA)及 abscisic acid (ABA)調控(Chen et al., 2010)。根據本實驗室先前研究結果，*OsSUT1* 於上位葉葉鞘之基因表現在抽穗後時期明顯高於抽穗前時期，而 *OsSUT1* 於葉鞘的表現會受 ABA 所調控(Chen and Wang, 2008; Chen and Wang, 2012)。在 *OsSUT1* 的表現分析上，根據在水稻種子萌芽時期的免疫定位和啟動子的表現分析中可得知 *OsSUT1* 主要位於韌皮部細胞 (Scofield et al., 2007)。以轉殖方式抑制 *OsSUT1* 基因表現後，發現穀粒充實百分比和種子發芽的速率顯著降低(Scofield et al., 2002)，*OsSUT1* 功能下降亦會影響花粉之正常功能(Hirose et al., 2011)。

*OsSUT2*, 3, 4 及 5 於發育中之穗部，於開花後一至七天的時間表現變化並沒有明顯的差異，但是於開花後期則會顯著下降(Aoki et al., 2003; Sun et al., 2008)。在 *OsSUT2* 功能性研究中，以 T-DNA 破壞 *OsSUT2* 的表現會延遲水稻生長、穀粒千粒重下降及分蘗數降低，且發現於突變株的葉片中會累積較多的可溶性糖類 (Eom et al., 2011)。在 *OsSUT2* 次細胞定位上，本實驗室藉由 *OsSUT2* 和 GFP 報導基因所產生融合蛋白進行大麥糊粉層暫時性表現分析，結果顯示 *OsSUT2* 位在細胞膜上的膜蛋白(Siao et al., 2011)。水稻種子胚中的 *OsSUT2* 基因表現會受到胚乳所提供的糖類分子所誘導調控，在發芽後第五天有高的表現量，研究結果指出

其是透由 hexokinase-independent 途徑 (Siao et al., 2011)。根據本實驗室先前研究生蕭惠心藉由 *OsSUT2* 和 *OsSUT4* 啟動子接上 GUS 報導基因轉植水稻之分析結果，*OsSUT2* 及 *OsSUT4* 基因於根及葉部均具維管束韌皮部表現專一性；在穎花中，*OsSUT2* 及 *OsSUT4* 抽穗前主要表現於內外穎之穎脈，隨著開花授粉後逐漸表現下降，而轉向於雌蕊及雄蕊上的表現。而隨著花粉的成熟，*OsSUT4* 之基因表現及啟動子活性表現也逐漸增加。水稻根系部分，*OsSUT2* 及 *OsSUT4* 啟動子主要於種子根之根尖及側根形成處。而水稻根系 *OsSUT2* 及 *OsSUT4* 基因表現可受蔗糖及葡萄糖促進 (蕭,2011)。

#### 4. 糖類相關轉運蛋白及代謝相關基因受機械性傷害逆境的影響

植物受到刻傷逆境後，在受傷部位需要較多的碳源的供給，以做為一個訊號分子誘導下游防禦基因表現、或是生合成相關抗蟲的蛋白以植物取食、二次代謝物或用以產生能量、修補作用相關的二次代謝物碳骨架的來源(Ibraheem et al., 2008)，由阿拉伯芥葉片中觀察到機械性刻傷後，木質素生合成相關的基因確實會明顯的被提升，並在傷口周圍觀察到有木質素的前驅物酚類物質的累積 (Delessert et al., 2004)。利用 real-time RT-PCR 分析發現，*OsSUT2* 及 *OsSUT4* 兩基因在受到機械性傷害逆境後，基因表現都會有促進的現象，*OsSUT2* 和 *OsSUT4* 分別在 1 小時和 30 分鐘表現量達最高，並隨著時間而表現量下降(蕭惠心論文, 2011)。阿拉伯芥的蔗糖轉運蛋白 *AtSUC3* 主要表現於保衛細胞、表皮絨毛、花粉萌發處、根尖端及發育中的種皮，其在葉部之表現受到刻傷逆境後亦可被明顯誘導啟動子活性和基因表現(Meyer et al., 2004)。在機械性傷害逆境對單糖轉運蛋白研究中，阿拉伯芥的單糖轉運蛋白 *AtSTP4* 啟動子活性和基因的表現亦會受到刻傷逆境而誘導(Truernit et al., 1996)。Cell wall invertase (CIN)在細胞間隙扮演一個將間隙中的蔗糖水解成葡萄糖和果糖的重要角色(Sherson et al., 2003)，前人研究中發現當 CIN 的功能下降後，在玉米會發現其對於種子的發育會受到抑制(Cheng et al., 1996)，胡蘿蔔的根生長發育亦會受到 CIN 的缺失而抑制根尖生長(Tang et al., 1999)。在阿拉伯芥、豌豆、甜菜等確實都可看到當受到機械性傷害後其 cell

wall invertase 的基因表現量會顯著的提升(Zhang et al., 1996; Rosenkranz et al., 2001; Quilliam et al., 2006)。而 Singer 等人(2011)的研究亦顯示柑橘的蔗糖分解的酵素(sucrose synthase)，啟動子也會受到機械性傷害而誘導表現。

## 5. 植物受機械性傷害和昆蟲咬食所引起之異同

植物受到生物逆境後，會產生許多防禦機制以抵抗這些傷害，菸草在刻傷後會增加尼古丁合成(Baldwin et al., 1997)以減少昆蟲對其危害情形，另一方面昆蟲為了降低植物所產生的防禦反應，而昆蟲與植物共同演化的結果而產生另一種的適應的機制，許多咬食性昆蟲和韌皮部刺吸式昆蟲的唾液中發現 glucose oxidase (GOX)，GOX 會抑制植物在受到生物逆境後所產生尼古丁的量，昆蟲可透由唾液中相關酵素去抑制植物的防禦表現，使昆蟲的取食可順利進行(Musser et al., 2002; Tian et al., 2012)。植物對於機械性刻傷和受到昆蟲危害時其表現機制會有所不同，植物受到昆蟲為害時，除了受到機械性傷害外，更會伴隨唾液成份的化學性的刺激，根據 microarray 資料顯示比較一般刻傷逆境和受到昆蟲危害的基因表現上，其都會去誘導 oxylipins pathway 上的基因表現，如 lipoxygenase (LOX)、12-oxo-phytodienoic acid reductase、allene oxide synthase (AOS)、hydroperoxide lyase 等基因表現，另亦會誘導脫水逆境相關的基因，如 late embryogenesis abundant-like protein (如 ER5 基因)和 dehydrin-like protein 相關的基因(如 XERO2 基因)表現，但在昆蟲處理組中發現會受誘導的 hevein-like protein (HEL)基因，其表現並不會受單純的刻傷處理所誘導。HEL 基因為一病原微生物的防禦基因，結果推測可能受昆蟲分泌物的刺激而誘導表現(Reymond et al., 2000)。

## 6. 刻傷逆境的訊息傳導因子

植物受到刻傷逆境刺激後，將經過各種訊息傳導途徑，啟動植物的防禦反應及修補機制，以減少對植物所造成的衝擊。這些訊息傳導因子包括茉莉酸(jasmonate)、水楊酸(salicylic acid; SA)、離層酸(abscisic acid; ABA)、乙烯(ethylene)、一氧化氮(Nitric oxide; NO)和過氧化氫(hydrogen peroxide)等(Huang et al., 2004;



Erb et al., 2012)。在刻傷逆境下，植物體內訊息的傳導並非只有單因子的改變，而是同時調控各種荷爾蒙和其內部氧化狀態，以調控下游同個基因或是不同的基因表現(Erb et al., 2012)。

茉莉酸為一個刻傷逆境荷爾蒙(Koo and Gregg 2009)，植物受到刻傷逆境後可觀察到茉莉酸生合成路徑上的基因會被誘導，如 *LOX*、*AOS* 和 *allene oxide cyclase (AOC)* (Ralph et al., 2006)。水稻和阿拉伯芥受到刻傷逆境後，分別在 30 分鐘和 1 小時誘導內生茉莉酸含量達最高量(Rakwal et al., 2002; Onkokesung et al., 2010)。在甘藷中發現 *sporamin* 基因會受刻傷誘導，其亦是透由茉莉酸途徑調控此誘導反應(Wang et al., 2002)。累積的茉莉酸會和植物體內的 *isoleucine* 透由 *JASMONATE RESISTANT1 (JAR1)* 轉變成 *JA-Ile*，*JA-Ile* 會活化 *SCF<sup>COI1</sup>* 去接合於 *JAZ* 這 repressor，促使 26S proteasome 將結合於目標基因啟動子上的 repressor 將其分解，而促進下游基因表現的進行(Howe and Georg 2008)。

*SA* 為植物防禦病菌之主要機制之一(Wang et al., 2013)，前人研究發現受到機械性傷害逆境後 *SA* 生合成的關鍵蛋白 *Phenylalanine ammonia-lyase (PAL)* 酵素活性和基因表現上都會受到促進(López-Gálvez et al., 1996; Mur et al., 2002)，其不只會受到機械性傷害誘導反應，也會參與蚜蟲、白背飛蝨等刺吸式口器的昆蟲誘導反應，而可透由 *SA* 路徑去誘導 *nonexpresser of PR genes* 和病原菌防禦相關的 *pathogenesis-related protein* (Walling, 2000)。在阿拉伯芥研究中發現受到刻傷後 *SA* 的含量會上升，若同時處理昆蟲的分泌物，其 *SA* 含量上升會有增強趨勢(Schafer et al., 2011)。而 *SA* 亦會去抑制番茄在刻傷逆境下產生的 *proteinase inhibitor* (Doares et al., 1995)。

*ABA* 為一個缺水逆境荷爾蒙，由前人研究中知道機械性傷害會誘導部分缺水逆境相關的基因表現，已於不同的植物均觀察到組織受傷後 *ABA* 含量增加的現象(Schafer et al., 2011)，且 *ABA* 生合成關鍵酵素基因 *9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED)* 的表現有被誘導表現的現象(Suttle et al., 2013)，另外在馬鈴

薯和番茄的 proteinase inhibitor II (Pin II) 基因表現除了會受到刻傷逆境的誘導之外，也會受到 ABA 的誘導，另外以 ABA 生合成的缺失的植株發現到一樣受到刻傷逆境後無法誘導 *Pin II* 基因的表現量 (Pena-Cortes et al., 1989)。

乙烯為一個氣態分子的植物荷爾蒙，植物受到刻傷逆境後會有大量的乙烯產生 (Boller and Hans 1980)，生合成關鍵基因 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (ACS) 和 Aminocyclopropanecarboxylate oxidase (ACO) 亦會受刻傷刺激誘導表現上升 (Ralph et al., 2007)。

前人研究中發現受到刻傷逆境後，植物的組織會有過氧化氫 hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) 產生，在馬鈴薯、玉米和豌豆等植物受到刻傷逆境後，以 diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 進行過氧化氫定性染色，可觀察到在葉片中會有明顯的  $H_2O_2$  累積 (Orozco-Cárdenas and Clarence 1999)，並發現在刻傷時會透由 oxylinpins pathway 途徑誘導 NADPH oxidase 的酵素活性，進而促使  $H_2O_2$  的產生。在刻傷逆境後，番茄 proteinase inhibitor I (Pin I) 和 proteinase inhibitor II (Pin II) 表現會受到誘導增加，而在外加 NADPH oxidase 抑制劑後，明顯抑制刻傷下 Pin I 和 Pin II 的誘導表現 (Orozco-Cárdenas et al., 2001)。

## 7. 本論文研究主題

本實驗室蕭惠心研究生發現 *OsSUT4* 的基因表現會受到機械性傷害所誘導，本論文主題為延續探討 *OsSUT4* 受刻傷逆境誘導表現之訊息調控途徑。本研究內容主要包含：(1) 探討不同取食行為昆蟲對 *OsSUT4* 基因表現的影響；(2) *OsSUT4* 所受刻傷逆境誘導表現之訊息傳導途徑；(3) 探討 *OsSUT4* 基因啟動子上受刻傷刺激調控之序列區域。

## 材料與方法



### 1. 植物材料

台農 67 號水稻(*Oryza sativa* L. cv. Tainung 67 ; TNG67)。

### 2. 種子消毒和植株培養

- (1) 種子以 1% (v/v) 次氯酸鈉 NaOCl 消毒 30 分鐘(每 15 分鐘換一次消毒水)，並以清水沖洗至消毒水味道消失，最後一次用蒸餾水潤洗，平鋪於培養皿中的濕潤擦手紙上。
- (2) 於 30°C 植物生長箱中黑暗培養三天。
- (3) 第三天將有發芽的種子移至 150 ml 玻璃燒杯之鐵網架上，置於 30/ 25°C(日溫/夜溫) 植物生長箱中，光週期為 12/12 小時，每隔三天更換一次木村氏水耕液 (附表三)。

### 3. 水稻機械性傷害處理

將培養至三葉齡的 TNG67 水稻幼苗，於第三片葉身處理刻傷逆境，以主脈為界線分左右兩部分，並以剪刀各處理五刀，均勻於葉面上，處理時避開主脈。

啟動子活性分析方面為了減少在轉植株中，轉入不同套數、插入的位置及同質或異質的影響，將水稻三葉齡第三片葉身一半分為尖端(Tip)和基部(Base)，於基部處理刻傷逆境，觀察自身尖段和基部受誘導報導基因的表現(附圖三)。

### 4. 三葉齡水稻幼苗斜紋夜盜蟲餵養處理

- (1) 由台灣大學昆蟲系楊恩誠老師所提供斜紋夜盜蟲 *Spodoptera litura*。
- (2) 以毛筆刷挑取斜紋夜盜幼蟲，讓蟲飢餓 4 小時。
- (3) 將蟲放於第三片葉身上，餵養處理 1 小時，餵養密度為 10 隻/株。
- (4) 將蟲和水稻苗分開，收取第三片葉身，以液態氮快速冷凍，保存於-80°C 冰箱。



## 5. 三葉齡水稻幼苗的褐飛蝨餵養處理

- (1) 由中興大學昆蟲系戴淑美老師所提供的褐飛蝨 *Nilaparvata lugens* (Stål)，並以水稻苗飼養之。
- (2) 以吸蟲管吸取第三、第四齡的褐飛蝨若蟲，根據行政院農業委員會動植物防疫檢疫局的植物保護圖鑑(李, 2002)，第三齡蟲長度約為 2.0 mm，第四齡約為 2.4 mm。
- (3) 以生長到三葉齡的 TNG67 水稻苗餵養褐飛蝨，處理密度為 8 隻/株，處理時間為 12、24、48 和 72 小時，收取水稻莖桿的部分，十株為一個樣品數並用液態氮快速冷凍，保存於-80°C 冰箱。

## 6. 水稻植株内生糖含量測定

### 6.1 測定材料

將生長至 TNG67 三葉齡的水稻植株更換水耕液後，置放於植物生長箱中，避光處理 48 小時，對照組為在正常光照下生長。

### 6.2 水稻葉身可溶性糖含量測定(高, 2005)

- (1) 以每 10 片葉身為一重複樣品並秤重。
- (2) 以液態氮將樣品研磨製粉末，加入 2 ml 80%(v/v) 乙醇於 80°C 萃取 15 分鐘。
- (3) 4°C、3000 x g 離心 10 分鐘。
- (4) 將上清液吸取至新的微量離心管中。
- (5) 重複步驟(3)~(4)兩次。
- (6) 將樣品體積以 80%(v/v) 乙醇補齊至 10 ml，即為水溶性醣類溶液。
- (7) 每個樣品取 100 µl 水溶性醣類溶液以真空抽氣抽至乾燥。
- (8) 加入 50 µl chloroform 和 200 µl 二次水溶解乾燥樣品。
- (9) 混勻後以 13,230 x g, 4°C 離心 15 分鐘。
- (10) 取 40 µl 上清液並加入 360 µl 二次水混合均勻，並同時配置葡萄糖標準溶液。

(11)於冰上緩慢加入 600  $\mu$ l Anthrone solution(0.2 g Anthrone 溶於 100 mL 95%硫酸)

(12)以 100°C 沸水反應 7.5 分鐘。

(13)冷卻後於 630 nm 波長下測量其吸光值。

(14)利用所得到的樣品吸光值代入標準曲線公式，乘上稀釋倍數 6.25，最後除以鮮重，即得到每單位鮮重所含有的醣含量。

6.3 黑暗處理 48 小時之後，對水稻第三片葉身做刻傷處理，於刻傷處理 30 分後收取材料偵測其 *OsSUT4* 的基因表現變化。

## 7. MeJA、SA、ABA、ET 荷爾蒙藥劑處理

將生長至三葉齡的水稻幼苗處理 100  $\mu$ M 的 Methyl jasmonate (MeJA) 2 小時、Salicylic acid (SA) 和 Abscisic acid (ABA)在培養水耕杯中，處理時間為 30 分、1 小時、2 小時、6 小時和 12 小時。100  $\mu$ M Ethephon (ET)處理在培養的水耕杯中，並放置於獨立的生長箱中，處理時間為 1 小時、2 小時、6 小時和 12 小時。收取材料第三片葉身，十株為一個樣品並以液態氮快速冷凍。

## 8. 荷爾蒙、過氧化氫生合成抑制劑前處理

8.1 植物荷爾蒙抑制劑處理對於刻傷誘導 *OsSUT4* 基因表現影響

在處理機械性傷害前 12 小時處理 Jasmonate 生合成抑制劑 aspirin(Asp; Sigma-Aldrich®) (Pēna-Cortés et al., 1993) 100  $\mu$ M。Abscisic acid 生合成抑制劑 Fluridon(Flu; Fluka) 100  $\mu$ M、Ethylene 生合成抑制劑 2-Aminoisobutyric acid(AIB; Alfa Aesar®)10  $\mu$ M 和 100  $\mu$ M 24 小時前處理後對植株做刻傷逆境，30 分鐘後收取材料偵測 *OsSUT4* 基因表現情形。

8.2 NADPH oxidase 抑制劑處理

在刻傷處理前 6 小時噴灑 Diphenyleneiodonium chloride(DPI; Sigma-Aldrich®) 10 mM 於水稻地上部，以抑制植物體中 NADPH oxidase 在逆境下所產生的過氧化氫(Orozco-Cárdenas et al., 2001)。並於刻傷處理後在噴灑 1 次 10 mM DPI 於葉



身刻傷處，待刻傷後 15 分、30 分收取材料分別測定內生  $H_2O_2$  的量和 *OsSUT4* 的基因表現



## 9. 過氧化氫定性及定量測定

### 9.1 刻傷逆境下過氧化氫( $H_2O_2$ )定性觀察(Orozco-Cárdenas and Clarence 1999)

利用 Diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB; Sigma-Aldrich®)進行染色，其會與  $H_2O_2$  產生棕色化合物，而達定性觀察目的。取三葉齡水稻幼苗第三片葉身，以剪刀處理機械性傷害，在葉身兩側分別剪 5 刀並且避開主脈，並將葉身剪下後放於 15 ml 離心管中加入 DAB 溶液(0.5 mg/mL,pH 3.8)。於 37°C 生長箱反應 12 小時，換成 95%酒精以 80°C 熱水浴 20 分鐘脫去葉綠素，再換成 70%酒精保存，並做後續拍照。

### 9.2 刻傷逆境下過氧化氫( $H_2O_2$ )定量測定(高, 2005)

- (1) 收取受刻傷後的第三片葉身並稱重，每一樣品約為 45 mg~50 mg。
- (2) 將樣品磨碎後加入 1.5 ml 的 Sodium phosphate buffer(50 mM，pH 6.8，內含 1 mM Hydroxylamine)。
- (3) 以 4°C，6000 xg 離心 25 分鐘。
- (4) 吸取 1 ml 上清液至新的離心管中。
- (5) 加入 0.5 ml  $TiCl_4$ (Titanium chloride(0.1%，v/v)溶於 20%(v/v) $H_2SO_4$ )
- (6) 震盪均勻後，於室溫下以 1000 xg 離心 15 分鐘。
- (7) 吸取 200  $\mu$ L 上清液測定  $OD_{410}$  的吸光值
- (8) 並帶入以  $H_2O_2$  所作的標準曲線公式中，最後乘上稀釋倍數和除以鮮重，可得到每單位鮮重下有多少量的  $H_2O_2$ 。

## 10. 穩定性表現系統進行啟動子活性分析

10.1 *OsSUT4* 基因啟動子-*GUS* 轉殖水稻 *POsSUT4*(-434/-11)::*GUS*(由陳懷如博士於本實驗室建立)。

10.2 構築水稻蔗糖轉運蛋白 *OsSUT4* 基因啟動子穩定性表現載體


由本實驗室先前研究生陳懷如博士所構築於CYH10(台大農化系洪傳揚老師所提供載體;附圖一) *OsSUT4* 啟動子全片段，設計正向引子並帶有 *SacI* 限制酵素切位，配合位於-11 的反向引子並帶有 *SmaI* 限制酵素切位(附表一)，以 Polymerase chain reaction; PCR(Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity DNA polymerase) 反應得到 *POsSUT4*(-802/-11)、(-483/-11)和(-248/-11)的三個啟動子片段，以限制酵素 *SacI* 和 *SmaI*(BioLabs Inc.)將啟動子片段切開後接入 CYH10 的載體上，確定序列正確後再將此一構築以 *SacI* 和 *HindIII* 兩限制酵素切下後接到穩定性表現載體 pCambia1302(附圖一)上，構築好的載體以 *SacI* 和 *SmaI* 限制酵素作用，確認構築長度正確。

### 10.3 EHA105 農桿菌勝任細胞的製備

- (1) 從 YEP 固體培養基 (10 g Bactopeptone、10 g Yeast extract、5 g Sodium chloride、15 g Agar 溶於 1 L 的 dH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中;pH 5.7)挑選 EHA105 單一菌落，培養於 3 ml YEP 液體培養基中(10 g Bactopeptone、10 g Yeast extract、5 g Sodium chloride 溶於 1 L 的 dH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中;pH 5.7)。
- (2) 於 28°C 震盪培養 2 天。
- (3) 取 1 ml 菌液加到 50 ml YEP 液體培養基繼續培養，每隔約 30 分以分光光度計測定 OD<sub>600</sub> 的讀值，直到讀值為 0.5 到 1。
- (4) 將菌液到入是先預冷的離心管中，以 4°C、3829 xg 離心 7 分鐘。
- (5) 倒掉上清液後加入 200 ml 預冷的無菌水，混合均勻後以 4°C、3,829 xg 離心 7 分鐘。
- (6) 倒掉上清液後加入 40 ml 預冷的 10% glycerol，混合均勻以 4°C、1,378 xg 離心 20 分鐘。
- (7) 倒掉上清液，加入 3ml 預冷的 10% glycerol 並混合均勻，以 40 μl 分裝於微量離心管中，保存於-80°C 備用。

### 10.4 EHA105 農桿菌轉型

- (1) 將 EHA105 勝任細胞放置於冰上溶解，並預冷電穿孔法用的 cuvette。

- 
- (2) 取 100 ng 接有 POsSUT4(-248/-11)、(-483/-11)和(-802/-11)啟動子片段的 pCambia1302 質體 DNA 加到 EHA105 勝任細胞中混合均勻，並加入至預冷的 cuvette 中。
  - (3) 將 cuvette 放於 Electroporation Apparatus (Bio-Rad)中，選擇 Agro 模式並按下 Pulse。
  - (4) 將菌液重新懸浮於 1 ml 的 YEP 液體培養基，於 28°C 震盪培養 60 分鐘。
  - (5) 將菌液塗於含有抗生素 Kanamycin 的固體 YEP 培養基上，於 28°C 培養 2 天。

#### 10.5 水稻癒傷組織的誘導(相關培養基於附表四)

- (1) 以水稻 TNG67 乳熟期到糊熟期間的未成熟種子為材料，收取後存放於 4°C 冰箱備用。
- (2) 將未成熟的種子去掉內外穎以消毒水(1%NaOCl 及一滴 Tween-20)消毒 30 分鐘。
- (3) 在無菌操作台內，以無菌水沖洗至完全移除消毒水。
- (4) 將清洗過的種子放於 CIM 固體培養基上，以 3M 透氣膠帶封邊，放於 27°C 全光照下培養，約培養 4~6 週。
- (5) 挑出由胚盤長出的癒傷組織，移到新的 CIM 培養基中，經過約 2 到 3 週選取直徑 2-5 mm 的癒傷組織進行農桿菌轉殖。

#### 10.6 水稻農桿菌轉殖(相關培養基於附表四)

- (1) 取轉型成功的農桿菌培養於 3 mL YEP 液體培養基中(含 50 µg/ml Kanamycine)，於 28°C 震盪培養 2 天。
- (2) 取 0.5 ml 菌液加到 50 ml AB 培養基中(含 50 µg/ml Kanamycin)，於 28°C 震盪培養，每隔一段時間(約 1 小時)測定其 OD<sub>600</sub> 讀值，直到 OD<sub>600</sub> 落在 0.8-1.0 之間。
- (3) 以 4°C、3,840 xg 離心 7 分鐘，去掉上清液，加入 10 ml MS 液態培養基，使菌體懸浮於培養基中，倒入無菌的 petri dish 中。
- (4) 將水稻癒傷組織浸於菌液中，在取出培養於 2N6AS 的固體培養基中，在 27



°C 黑暗中培養 3 天。

- (5) 收取感染的癒傷組織，以無菌水、MS 液態培養基交替清洗，最後以含有 250  $\mu\text{g/ml}$  Cefotaxime MS 液態培養基清洗，並每小時洗一次。
- (6) 將洗淨的癒傷組織移到含有 50  $\mu\text{g/ml}$  hygromycin 和 250  $\mu\text{g/ml}$  Cefotaxime 的固態篩選培養基中，於 27°C 全光照下培養，約 4 週可得到轉型成功的癒傷組織。
- (7) 將繼續生長的癒傷組織移到 PM 固體培養基中，於 27°C 全光照下培養約 10 天，誘導長出芽。
- (8) 將長出芽的癒傷組織移到 MS 固體培養基中，可促進其發根。
- (9) 3 週後可將水稻苗移出，並進行馴化後種植於土盆中。

#### 10.7 轉殖水稻 GUS 活性之組織化學染色分析

參考 Jefferson (1987)，進行 GUS 染色分析。

- (1) 將材料置入染色液 [ 0.1 M  $\text{NaPO}_4$  buffer (pH 7.0), 10 mM EDTA, 0.5 mM potassium ferricyanide (  $\text{K}_5[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  ), 0.5 mM potassium ferrocyanide (  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  ), 1 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronide (X-Gluc), 0.1 % Triton X-100 ] 中。
- (2) 放於 37°C 黑暗培養箱中反應 2 小時。
- (3) 反應完以 70% 酒精保存。

### 11. 基因表現分析

#### 11.1 水稻總 RNA 的萃取

- (1) 收取水稻各組織材料，以液態氮急速冷凍並保存於 -80°C。
- (2) 將約 0.1 g 的材料放入先以液態氮預冷的研鉢中，並利用液態氮研磨成粉末。
- (3) 加入 1 ml Trizol Reagent (Invitrogen) 或 Azol<sup>®</sup> (RNA Isolation reagent) 混合均勻，待研鉢中的樣品恢復至液態時，吸取其萃取液至微量離心管中。
- (4) 於室溫下靜置 5 分鐘。



- (5) 以  $7,830 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  離心 5 分鐘。
- (6) 吸取上清液至新的微量離心管，加入 0.2 ml chloroform，均勻混合 3 分鐘。
- (7) 以  $11,270 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  離心 15 分鐘。
- (8) 吸取出上清液至新的微量離心管，加入 0.5 mL 100% isopropanol 混合均勻，於室溫靜置 10 分鐘。
- (9) 以  $13,230 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  離心 15 分鐘。
- (10) 去除上清液，加入 1 ml 75% 酒精清洗沉澱物。
- (11) 以  $13,230 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  離心 15 分鐘。[重複步驟(10)和(11)一次]
- (12) 去除酒精，以真空乾燥機抽氣 10 分鐘。
- (13) 以適量含 0.1% diethyl pyrocarbonate (DEPC, Sigma) 的  $\text{dH}_2\text{O}$  加入乾燥好的 RNA 中，於  $37^{\circ}\text{C}$  乾浴槽進行溶解 30 分鐘。
- (14) 以  $9,750 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  離心 3 分鐘，吸取上清液。
- (15) 以 Spectrophotometer (Thermo NANODrop1000) 測定 RNA 濃度。

#### 11.2 TURBO DNase 處理

去除 RNA 樣品中 genomic DNA 的干擾，使用 TURBO DNA-free™ kit (Ambion)。

- (1) 取 6  $\mu\text{g}$  total RNA 樣品加 DEPC 水至 35  $\mu\text{L}$ ，加入 4  $\mu\text{L}$  10X TURBO DNase buffer 及 1  $\mu\text{L}$  (2U/ $\mu\text{L}$ ) TURBO DNase，總反應體積為 40  $\mu\text{L}$ 。
- (2)  $37^{\circ}\text{C}$  反應 30 分鐘。
- (3) 加入 4  $\mu\text{L}$  inactivation reagent 於室溫下作用 2 分鐘。
- (4) 以  $10,000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  離心 2 分鐘，取上清液至微量離心管保存於  $-20^{\circ}\text{C}$ 。

#### 11.3 RNA 電泳

- (1) 取 1  $\mu\text{g}$  總 RNA 於微量離心管，並加入 10  $\mu\text{L}$  denature buffer (15 mL Formamide, 0.6 mL Formaldehyde, 3 mL 10X 3-N-morpholino propanesulfonic acid (MOPS) (Amresco), ethidium bromide (Sigma))。
- (2) 放於  $65^{\circ}\text{C}$  乾浴槽上 15 分鐘。

- (3) 將樣品置於冰上 10 分鐘。
- (4) 準備 RNA 膠體 (1% agarose, 75% formaldehyde, 10% MOPS buffer (20 mM MOPS, 5 mM sodium acetate (Merck), 1 mM ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA) (Merck), 0.01% DEPC (pH 7)) 及電泳溶液(1% MOPS)。
- (5) 以 50 伏特電壓進行 40 分鐘電泳。

#### 11.4 即時反轉錄聚合酶連鎖反應(real-time RT-PCR)

使用 TAKARA BIO<sub>INC.</sub>的 One step SYBR<sup>®</sup> PrimeScript<sup>™</sup> RT-PCR Kit II(Prefect real time)(Cat.#RR086A), 並以 Stratagene MX3000P<sup>™</sup> 機器進行即時反轉錄聚合酶連鎖反應, 所得結果利用 MxPro QPCR Version 3.00 軟體進行分析。針對即時反轉錄聚合酶連鎖反應對目標基因設計專一性引子 (附表一), 並於適當的黏合溫度下進行片段的擴增。Real-time RT-PCR 反應組成如下表所示, 反應程序為 42°C 5 分鐘, 95°C 10 秒, 95°C 5 秒、60°C 30 秒循環數為 40 個, 95°C 15 秒, 60°C 1 分鐘, 95°C 15 秒。

RNase-free H <sub>2</sub> O (0.1%DEPC)	8 μL
2XSYBR QRT-PCR buffer 4	12.5 μL
5'-primer 10 μM	1 μL
3'-primer 10 μM	1 μL
ROX ref. dye II	0.5 μL
RNA template 100ng	1 μL
PrimeScript 1 step Enzyme Mix 2	1 μL
<b>Total vol</b>	<b>25 μL</b>

進行 real-time RT-PCR 偵測基因表現的結果, 以 *Ubiquitin* 基因作為 internal control, 利用 Ct 值計算出相對表現量 (Relative quantitation), 計算公式如下所示:

$$\text{Target gene mRNA level} / \text{Ubiquitin mRNA level} = 2^{-(\text{Ct Target gene} - \text{Ct Ubiquitin})} = 2^{-\Delta\text{Ct}}$$

## 結果

### 1. 機械性傷害對 *OsSUT4*、*OsCINI* 及水稻單糖轉運蛋白 *OsMST6* 基因表現影響

於水稻 TNG67 三葉齡幼苗之第三片葉身以剪刀進行刻傷處理，左右各剪 5 刀，並避開主脈，於同一時間點收取材料，不同時間點做刻傷處理，分別收取對照組(沒刻傷處理)及刻傷後 15 分鐘、30 分鐘、1 小時和 12 小時之葉身材料偵測 *OsSUT4*、*OsCINI* 及 monosaccharide transporter (*OsMST6*) 基因表現變化量。結果顯示機械性傷害可誘導 *OsSUT4* 基因表現，其 mRNA 量於刻傷處理 15 分鐘後即有明顯提升，而在 30 分鐘可誘導 2.7 倍，到此誘導效應於刻傷處理 1 小時後則漸緩(圖一)，此現象與本實驗室先前研究生蕭惠心(2011)的結果相同。另外蔗糖分解酵素 *OsCINI* 基因表現亦可受到刻傷誘導，在刻傷處理 30 分鐘後可誘導到 2.6 倍。*OsMST6* 亦會受到機械性傷害誘導，在一小時可達誘導最高的 11 倍，且 *OsCINI* 及 *OsMST6* 基因受機械性傷害影響之表現形式與 *OsSUT4* 相似，均於較長時間(例如 12 小時)被明顯表現量下降。

### 2. 斜紋夜盜蟲對水稻蔗糖轉運蛋白的影響

斜紋夜盜蟲 *Spodoptera litura* 為一植食性昆蟲，會於葉片以啃咬方式為害作物。在斜紋夜盜蟲(台大昆蟲系楊恩誠老師提供)三葉齡水稻餵養實驗中，處理斜紋夜盜蟲 1 小時後 *OsSUT4* 的基因表現有誘導達 1.7 倍，而刻傷處理組的為 2 倍(圖二)。

### 3. 褐飛蝨對水稻蔗糖轉運蛋白的影響

褐飛蝨 *Nilaparvata lugens* 有別於一般鱗翅目害蟲，其對於水稻之危害位於莖稈上，以刺吸式口器吸取水稻韌皮部中物質，為了瞭解其是否有別於一般機械性傷害對蔗糖轉運蛋白基因的影響，將褐飛蝨(中興大學昆蟲系戴淑美老師提供)共同培養於三葉齡水稻中 12 小時、24 小時、48 小時和 72 小時，培養密度為每株水稻 8 隻褐飛蝨。實驗中可發現褐飛蝨都主要停於莖稈部分，

莖稈部位 *OsSUT1* 和 *OsSUT2*、*OsSUT4* 兩者之基因表現有相反的表現趨勢，*OsSUT1* 受到褐飛蝨危害時其基因表現會受誘導表現，其在褐飛蝨置入 72 小時可達 3.55 倍的表現量，而 *OsSUT2* 和 *OsSUT4* 基因表現則會受到褐飛蝨的抑制，與對照組比較其降低一半左右的基因表現(圖三)。

#### 4. 水稻內生糖含量對於刻傷逆境誘導 *OsSUT4* 基因表現影響

為了瞭解機械性傷害誘導的 *OsSUT4* 基因表現是否需要糖類的參與，因此將水稻 TNG67 三葉齡幼苗於黑暗中放置 48 小時，來降低其內生所含的總糖量。黑暗 48 小時後水稻第三片葉身的糖含量下降到對照組的十分之一(圖四 A)。在 *OsSUT4* 基因表現上，會受到黑暗的处理下降 1.8 倍。在刻傷誘導倍率上，對照組受到刻傷 30 分鐘後，*OsSUT4* 基因表現可誘導 4.1 倍，而黑暗 48 小時的处理組受到刻傷為誘導 3.3 倍(圖四 B)。

#### 5. 探討荷爾蒙是否參與機械性傷害誘導 *OsSUT4* 表現的調控機制

##### 5.1 MeJA 相關探討

在刻傷逆境後茉莉酸生合成關鍵酵素的基因 *OsAOS1* 和 *OsAOS2* 會明顯的受誘導，其基因表現量分別於 15 分鐘和 30 分鐘處理後明顯上升 25 倍和 6.9 倍，於 1 小時後基因表現而下降(圖五 A、B)。以 Aspirin (Asp; 抑制 Allene oxide synthase)(Pena-Cortés et al., 1993) 前處理 12 小時，在進行機械性傷害 30 分鐘後，對照組 *OsSUT4* 基因表現誘導達 3 倍，Aspirin 處理組誘導 0.8 倍。以外加 100  $\mu$ M MeJA 處理 2 小時，*OsSUT4* 基因表現有誘導 0.8 倍的表現(圖五 C)。而在前處理 Aspirin 12 小時和處理 MeJA 試驗組加上刻傷處理 30 分鐘後，*OsSUT4* 基因表現可誘導 3.7 倍 (圖五 C)。

##### 5.2 SA 相關探討

處理 Salicylic acid (SA) 於水耕杯中，隨著時間會有逐漸誘導基因表現的趨勢，在處理 1 小時後相對於對照組達誘導 2.5 倍，而在 2 小時後而逐漸下降，到 6 和 12 小時回到原來和對照組相同表現(圖六 A)。另由 *OsOPRI* 的基因表現上，證實 SA 的處理為一個有效的處理，明顯在 1 和 2 小時有誘導

表現(圖六 B)。

### 5.3 ABA 相關探討

為了解刻傷處理，對在 Abscisic acid (ABA) 生合成之影響，試驗中 ABA 生合成關鍵基因 *OsNCED1* 和 *OsNCED2* 基因表現，結果顯示兩個基因會被刻傷誘導表現，其中以 *OsNCED1* 在受到刻傷後 15 分鐘就會被誘導，在 30 分鐘和 1 小時誘導最高的誘導倍率 4.7 倍，而 12 小時回降至原來水平(圖七 A); *OsNCED2* 在 15 分尚無誘導表現，在 30 分鐘達最高誘導倍率 2.6 倍，在 1 小時呈現些微下降，至 12 小時則下降至比對照組還低的表現量(圖七 B)。 *OsDREB1F* 會受到 ABA 誘導反應基因(Wang et al., 2008)，由刻傷後的基因表現觀察到其在 30 分鐘會有誘導倍率 412 倍的表現量(圖七 C)。外加 100  $\mu$ M ABA 中，*OsSUT4* 的基因表現會隨著處理時間而有誘導表現，在 2 小時達誘導倍率 1.4 倍的誘導(圖七 D)。 *OsRab16A* 會對 ABA 產生反應而誘導表現的基因(Hong et al., 2009)，其在 ABA 外加處理實驗中其基因表現也有明顯的誘導表現達 1775 倍(圖七 E)。前處理 Fluridon (Flu; ABA 生合成抑制劑) 24 小時之後，在處理刻傷逆境處理，結果顯示前處理 Flu 下，機械性傷害會誘導 *OsSUT4* 基因表現達誘導倍率 3 倍，對照組為誘導倍率 2.3 倍(圖七 F); 另由 ABA 反應基因 *OsDREB1F* 基因表現結果，對照組可誘導 475 倍，而在 Fluridon 處理組的誘導倍率則降會 227 倍(圖七 G)。

### 5.4 乙烯相關探討

水稻葉身受到機械性傷害後，其乙烯相關生合成基因 *OsACS1* 在表現上沒有明顯的變動情形(圖八 A)，而在 *OsACS2* 基因表現在 30 分鐘有達到 7.1 倍的誘導倍率(圖八 B)，同樣的 *OsACO2* 基因表現也會受到刻傷逆境誘導，在 1 小時達 8.1 倍的誘導倍率(圖八 D)，而在 *OsACO1* 表現則相反，其基因表現會受到刻傷處理而有下降的趨勢(圖八 C)。在刻傷後乙烯的反應基因 *OsERF3* 會受到誘導，在 15 分鐘和 30 分鐘誘導倍率有 5.5 和 4.9 倍的誘導，1 小時後則明顯下降，到 12 小時的基因表現比未刻傷處理組要低。為了知

道乙烯是否會影響 *OsSUT4* 基因表現，以外加 100  $\mu\text{M}$  (Ethephon; ET 乙烯釋放劑)於水耕杯中，並置放於密閉的生長箱中，觀察 *OsSUT4* 基因表現情形，在結果中，乙烯的處理對於 *OsSUT4* 基因表現在 1 小時有 1.32 倍的誘導而下降(圖八 F)，並以 *OsOPR1* 做為一個 ET 處理有效的指標基因，確認處理為一個有效的處理(圖八 G)。以處理 2-Aminoisobutyric acid (AIB; 抑制 ACC oxidase 產生乙烯) 100  $\mu\text{M}$  的材料做刻傷逆境，結果顯示在 10、100  $\mu\text{M}$  AIB 前處理 24 小時下分別有倍率 4.5 和 4.28 倍的誘導 *OsSUT4* 表現量，而對照組有 5 倍的誘導表現量(圖八 H)，在乙烯反應基因 *OsERF3* 基因表現受刻傷的誘導倍率在對照組和 10  $\mu\text{M}$ 、100  $\mu\text{M}$  AIB 處理組分別為 8.5、7.5 和 7.6，而隨著濃度的提升會去抑制刻傷處理 *OsERF3* 的基因表現(圖八 I)。

## 6. 過氧化氫(Hydrogen peroxide)在刻傷逆境中對 *OsSUT4* 基因表現的影響

為了探討在刻傷逆境中 *OsSUT4* 基因表現的誘導，是否會透有刻傷逆境下所產生的  $\text{H}_2\text{O}_2$  進一步去誘導 *OsSUT4* 的基因表現，首先以 Diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB; 會與  $\text{H}_2\text{O}_2$  形成褐色化合物)染色法觀察  $\text{H}_2\text{O}_2$  表現位置，可觀察到刻傷處有  $\text{H}_2\text{O}_2$  明顯累積情形(圖九 A)，表示  $\text{H}_2\text{O}_2$  產生於刻傷位置處，進一步以定量方式測定葉片中  $\text{H}_2\text{O}_2$  的含量，可發現葉身受刻傷後內生的  $\text{H}_2\text{O}_2$  會有上升的趨勢(圖九 B)。為了降低在刻傷逆境下由 NADPH oxidase 所產生的  $\text{H}_2\text{O}_2$ ，以前處理 Diphenyleneiodonium chloride; DPI 觀察刻傷後 30 分 DAB 染色情況，在有處理 DPI 組在 DAB 染色上較對照組來的淺(圖九 A)，在  $\text{H}_2\text{O}_2$  定量上，在第 0 分鐘 DPI 處理組有較高的  $\text{H}_2\text{O}_2$  表現量，而在受到刻傷後而下降，對照組則呈現上升趨勢(圖九 B)。由 DPI 處理結果可顯示其可降低在刻傷後  $\text{H}_2\text{O}_2$  的產生量，進一步觀察 DPI 處理組和對照組在刻傷後 *OsSUT4* 基因表現情形，在 0 分鐘處理 DPI 組有相對於對照組要較高的表現量，而 15 分鐘沒有顯著的差異，在 30 分鐘 DPI 處理組相對於對照組有較低的表現量(圖九 C)。

## 7. 受刻傷逆境 *OsSUT4* 基因啟動子之活性探討

以未轉植株的 TNG67 為材料，將葉身分為尖端和基部處理，於基部做刻傷處理，來比較基部受到刻傷逆境後和自身尖端所誘導基因表現的倍率(附圖三)。結果顯示在基部受到刻傷後 30 分鐘 *OsSUT4* 基因表現相對於未受到刻傷的尖端會有 3.8 倍的誘導，而在沒有刻傷逆境組則沒有明顯的差異(圖十 A)。

由上述結果可將含有不同 *OsSUT4* 啟動子片段長度接有 *GUS* 報導基因的轉植株為材料，探討受刻傷誘導的啟動子調控區域。先以 real time RT-PCR 偵測各轉植株 *GUS* 報導基因的表現量，結果顯示在所使用的轉植株都有 *GUS* 基因的表現，而在 TNG67 的非轉植株中則偵測不到 *GUS* 基因表現。(圖十 B)，並以上述轉植株做為後續啟動子調控試驗。

為了探討 *OsSUT4* 的刻傷調控誘導機制位於的啟動子片段，由四個不同 *OsSUT4* 長度片段的啟動子接有 *GUS* 報導基因的轉植株為材料，由基部除上尖端的 *GUS* 基因表現，結果以倍率呈現(圖十一)。本實驗結果顯示由最長的啟動子片段 *POsSUT4(-802/-11)* 片段在刻傷處理後，受到刻傷的基部相對於未受刻傷的尖端會有 3.45~4.49 倍的誘導，*POsSUT4(-483/-11)* 片段為 3.83~6.06 倍的誘導、*POsSUT4(-434/-11)* 片段 3.73~4.03 倍和最短片段 2~5.72 倍的誘導。而在基部沒有處理刻傷逆境的 *GUS* 基因表現倍率上，各轉植株中其倍率從最低 0.83 倍到最高的 1.64 倍(圖十二)。



## 討論



### 1. *OsSUT4* 在植物受機械性傷害反應中可能扮演的角色

由先前 *OsSUT4* 啟動子接上 *GUS* 報導基因的轉植株分析中，結果顯示，*OsSUT4* 表現於根和葉片中的維管束韌皮部有表現專一性，在根部觀察到在側根生長處，*OsSUT4* 啟動子具高活性。另外在花粉成熟過程中，*pOsSUT4* 啟動子亦有活性增強之現象(蕭,2011)。由阿拉伯芥的放射性標定碳源的研究中，刻傷組織為一個 sink 組織(Quilliam et al., 2006)。*CIN* 為位於靠細胞間隙細胞壁上酵素，可將細胞間隙中蔗糖水解成兩個單糖，在水稻中發現 *OsCIN1* 基因表現在 sink 和 source 組織都有表現，而以 sink 組織較高，另外在水稻開花授粉後也可觀察到 *OsCIN1* 的基因表現明顯的上升(Hirose et al., 2002)。另外在植物受到寄生性的病原菌危害時會對植物造成一個強烈的 sink 組織的產生，而去誘導 *CIN* 和 monosaccharide transporter; *MST* 的基因表現，以提供 sink 組織需求的碳源供給(Fotopoulos et al., 2003)。由水稻葉身受到機械性傷害後的材料發現 *OsCIN1* 和 *OsMST6* 的基因表現會有顯著的誘導表現(圖一)，此一結果也可以在阿拉伯芥受到機械性傷害後 *AtSUC3* 和 *AtSTP4* 基因表現誘導上有相同情形，*OsMST6* 研究中為一個位於細胞膜上具有單糖轉運功能的蛋白質(Wang et al., 2008)，因此推測當水稻組織受到機械性刻傷後，會透由 *OsSUT4* 將蔗糖轉運進入傷口處的細胞間隙，在藉由位於細胞壁間隙的 invertase 將蔗糖水解變成單糖型式，最後由位於細胞膜上的單糖轉運蛋白 *OsMST6* 將單糖送進需要的細胞中，以提供受傷組織所要的碳骨架和能量來源。

### 2. 醣分子對於刻傷誘導 *OsSUT4* 表現的探討

先前研究顯示，部分會受刻傷誘導的基因，會因有醣類分子的參與而有誘導表現增強的趨勢(例如 *Pin1 II-PR* 和 *LOX* 基因等)(Sadka et al., 1994; Kim et al., 1991; Johnson and Ryan, 1990)。本研究結果發現，在黑暗 48 小時後水

稻植株體內的可溶性糖類含量明顯下降，而黑暗下受到機械性傷害仍會誘導 *OsSUT4* 基因表現的結果(圖四)，因此由此結果可推測醣類分子可能不會參與在刻傷逆境促進 *OsSUT4* 的基因表現，而醣類分子存在下可以促進刻傷誘導 *OsSUT4* 的基因表現。不過刻傷後。組織內部糖含量是否有變動，或是透由別的器官組織轉供給碳源，來調控刻傷後 *OsSUT4* 的表現情形仍須進一步對組織刻傷後偵測其醣類的變化情形。我們過去研究發現(蕭惠心, 2011)水稻根系在生長過程中，根的 *OsSUT4* 的基因表現會受到 3% 的蔗糖和葡萄糖誘導;另外在水稻葉鞘組織中，在抽穗後葉鞘內的葡萄糖和蔗糖會有上升的趨勢，其中葡萄糖和 *OsSUT4* 的基因表現有類似的趨勢(Chen and Wang 2008; 陳懷如, 2009)，推測 *OsSUT4* 基因表現受到刻傷後會透由 *CIN* 和 *MST* 的作用，使得刻傷處單糖含量增加進而調控 *OsSUT4* 的表現(圖四)。

### 3. 機械性傷害、斜紋夜盜蟲和褐飛蝨對 SUT 影響的探討

本研究結果發現斜紋夜盜蟲在啃食水稻葉片後，*OsSUT4* 基因表現和刻傷逆境都有誘導表現。本研究中刺吸式口器的昆蟲褐飛蝨，其為一刺吸口器的水稻害蟲，處理水稻植株中 *OsSUT1* 基因表現隨著時間處理而上升，*OsSUT2* 和 *OsSUT4* 則相反會受到褐飛蝨吸食而下降(圖三)，另外透由外加 JA 生合抑制劑、JA 對 *OsSUT4* 的誘導和刻傷下 AOS 基因表現變化，刻傷對 *OsSUT4* 的基因表現促進可能會透由 oxylipins 的路徑去調控(圖五)。本實驗材料以 TNG67 品種為試驗對象，TNG67 為一個對於褐飛蝨敏感的品種，不耐褐飛蝨的危害(曾,等 2003)，先前研究指出，在水稻褐飛蝨的抗性和不具抗性品種的 microarray 分析結果發現，在 JA 生合成路徑上相關基因之表現，及關鍵生合成基因 AOS 的表現都為下降，而另一生合成酵素 *OPR* 的基因表現在抗褐飛蝨品種中表現量會被誘導，而在不抗品種中表現則被抑制(Zhang et al., 2004)，同樣的在阿拉伯芥植株中，當受到同為刺吸式口器昆蟲—銀葉粉蝨(Silverleaf whitefly)危害後，發現在上游 oxylipins 生合成路徑上 Fatty acid desaturase 和下游的 JA 反應的相關基因(如: PDF1.2)會有表現量下降的

趨勢(Zarate et al.,2007)，因此刺吸式口器昆蟲和刻傷逆境中對 *OsSUT4* 基因表現的有所不同，可能原因為對於植物荷爾蒙 JA 不同調控的影響而不同，導致 *OsSUT4* 基因表現在一般機械性傷害和褐飛蝨危害下產生差異性。

褐飛蝨為韌皮部刺吸的昆蟲，以吸取韌皮部中養分為食物來源，褐飛蝨危害時推測其會降低韌皮部中糖類相關物質的含量(Khattab, 2007)。由前人研究中，*OsSUT1* 的基因表現在種子發芽時期，發芽第一天會受到糖類的抑制 (Chen et al., 2010)，推測在褐飛蝨處理下造成韌皮部中糖濃度的下降，會進而促進 *OsSUT1* 基因表現。水稻種子胚中的 *OsSUT2* 和 *OsSUT4* 基因表現會受到胚乳所提供的糖類分子誘導調控(陳, 2007; Siao et al., 2011)，本研究在黑暗處理中對於 *OsSUT4* 基因表現也呈現一個下降趨勢(圖四 B)，因此推測褐飛蝨會降低韌皮部中的糖含量而造成 *OsSUT2* 和 *OsSUT4* 基因表現下降的趨勢。

#### 4. 刻傷逆境下各荷爾蒙對 *OsSUT4* 表現的探討

由本試驗結果顯示刻傷逆境下會誘導 JA、ABA 和 ET 植物荷爾蒙合成關鍵基因的表現(圖五 A、B;圖六 A、B;圖七 A、B、D)，另外從前人研究也發現 SA 的生合成酵素 PAL 活性和基因表現都受到誘導(López-Gálvez et al.,1996; Mur et al.,2002)。另一方面在刻傷逆境下可以偵測到 *OsAOS1* 和 *OsAOS2* 的基因表現上升，可推測內生的 JA 含量為一個上升趨勢，另以 *OsDREBF1* 做為 ABA 的反應基因(Wang et al., 2008)，也可看到受到刻傷後也有上升趨勢(圖七 C)，也以 *OsERF3* 的乙烯反應基因反映出內生乙烯變化(圖八 E)，可證明 JA、ABA 和乙烯在水稻受刻傷後上升的情況(圖五 A、B;圖七 C;圖八 E)。而在外加 JA、SA、ABA 和 ET 的直接外加處理中發現，*OsSUT4* 的基因表現都會受到上述四種荷爾蒙的直接外加而促進基因表現，ABA 和乙烯誘導不明顯(圖五 C;圖六 A;圖七 D;圖八 F)。在前處理 JA、ABA 和乙烯三種荷爾蒙合成抑制劑後，處理刻傷實驗中，發現在外加 JA 生合成抑制劑 Aspirin 下，刻傷所促進 *OsSUT4* 的基因表現會有下降(圖五 F)。由 ABA 生合

成抑制劑處理加上刻傷實驗中，ABA 反應基因 *OsDREB1F* 會受到抑制劑 Fluridon 處理而降低刻傷所誘導表現，因此推測在刻傷逆境下抑制劑處理可降低內生 ABA 的產生(圖七 G)，而抑制劑處理組 *OsSUT4* 基因表現受刻傷誘導的倍率和對照組一樣沒有下降，可說明刻傷不會透由 ABA 路徑去誘導 *OsSUT4* 的基因表現。乙烯抑制劑前處理試驗中，以 *OsERF3* 基因表現可反應出內生的乙烯會有下降的趨勢，同樣也會降低刻傷所誘導 *OsERF3* 的基因表現，推測可降低刻傷所誘導的乙烯產生(圖八 I)，而 *OsSUT4* 的誘導倍率隨著抑制劑 AIB 上升只有些微下降(圖八 H)。因此水稻受到刻傷逆境後可能會透由 JA 路徑去促進 *OsSUT4* 的基因表現。先前研究指出 SA 可以作為植物體內訊息傳導調控的因子，調控體內氧化逆境程度而產生相關對生物性逆境的反應。當病原菌侵襲植物後，可以觀察到在感染部位會有 SA 的累積(Yang et al., 2004)，而 SA 會抑制植物體中 Catalase 酵素活性，造成植物體中  $H_2O_2$  增加，進一步調控 systemic acquired resistance (SAR) 反應，以增加植物對生物性逆境的防禦反應(Guo et al., 2007; Chen et al., 1993)。而本試驗中 *OsSUT4* 基因表現在外加 SA 後有促進表現的趨勢(圖五)，推測可能透由 SA 去抑制 Catalase 酵素活性而使  $H_2O_2$  的含量上升，最後使 *OsSUT4* 的基因表現上升(圖九)。

ABA 和乙烯的外加處理會誘導 *OsSUT4* 的基因表現(圖六 D; 圖七 E)，Chen 及 Wang (2012) 利用抽穗前的水稻葉鞘處理 100  $\mu$ M ABA，結果 *OsSUT1*、*OsSUT2* 和 *OsSUT4* 都會有促進表現調控的情況。乙烯對蔗糖轉運蛋白的研究中，目前已知在馬鈴薯中，處理 ethephon 會促進 *StSUT4* 的表現(Chincinska et al., 2008)。

## 5. 刻傷逆境下 $H_2O_2$ 對 *OsSUT4* 基因表現的影響探討

本研究以 DAB 定性染色法和四氯化鈦法定量，偵測水稻葉身受到機械性傷害後  $H_2O_2$  位置和其變化量。結果顯示刻傷處明顯的 DAB 染色呈現(圖九 A)，並且由定量結果進一步確實  $H_2O_2$  呈現上升趨勢(圖九 B)，本結果和 OROZCO-CARDENAS (1999) 在馬鈴薯、玉米、棉花、豌豆和黃瓜葉片中都

有一樣結果。NADPH oxidase 的抑制劑 DPI 前處理確實可抑制刻傷 30 分鐘後 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 產生的量，由基因表現 *OsSUT4* 在 DPI 處理組，在刻傷後基因表現的促進情形較於對照組要來的低，因此推斷在刻傷逆境會透由誘導 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 產生而去促進 *OsSUT4* 基因表現(圖九)。

在刻傷逆境下會有刻傷荷爾蒙 JA 生合成大量產生(Abraham and Gregg 2009)，而當植物外加 MeJA 處理或是遭受到昆蟲咬食逆境會去促進 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的產生(OROZCO-CARDENAS et al., 2001; Shivaji et al., 2010)，推測刻傷逆境下水稻可透由 JA 的生合成增加去促進 NADPH oxidase 產生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，並促進 *OsSUT4* 基因表現的上升。

## 6. 受到刻傷逆境調控的 *OsSUT4* 啟動子區域探討

Ibraheem 等人(2010)根據現有資料庫 Plant CARE、PLACE、Genomatix Matinspector professional 分析阿拉伯芥 9 個蔗糖轉運蛋白和水稻 5 個蔗糖轉運蛋白基因的啟動子序列，分析上游-1 ~ -1500 的 *cis*-acting element 的可能調控的序列。由根據 National Center for Biotechnology Information(NCBI)資料顯示，以 *OsSUT4* 轉譯起始點 ATG 的 A 為+1，到上個基因的轉譯終止的 TGA 的 A，中間的核苷酸長度為 848 的核苷酸，並將此長度定為 *OsSTU4* 的啟動子全長。而在本研究中發現外加 JA、SA、ABA 和 ET 皆會促進 *OsSUT4* 基因表現，由資料預測結果可以看到確實有許多調控 JA、SA 和 ABA 的 *cis*-acting element，如 ABRE、MYC、Me-JA motif 和 GT-1(附圖二)。

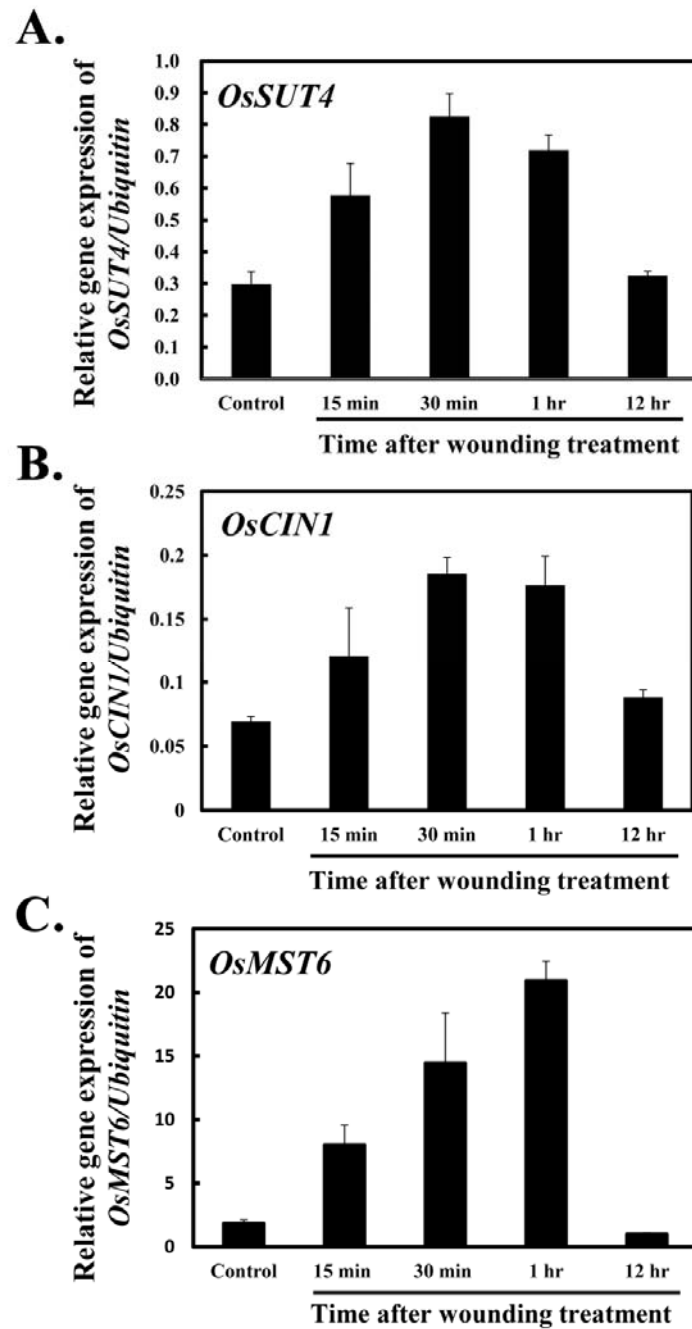
本試驗啟動子 *POsSUT4*(-802/-11)到最短片段 *POsSUT4*(-248/-11)仍會有刻傷誘導 *GUS* 報導基因的表現(圖十一)，由根據 Ibraheem 等人(2010)的整理分析，發現在 *OsSUT4* 啟動子 848 長度中，確實有 5 個受刻傷逆境誘導的 *cis*-acting element—W-box，一直到本試驗 *POsSUT4*(-248/-11)最短片段仍含有 1 個 W-box *cis*-acting element，因此仍須以更短片段啟動子的轉植株去做進一步確認。而在 *POsSUT4*(-248/-11)長度片段中也包含一段 MeJA motif 的 *cis*-acting element，由前面結果顯示刻傷逆境會透由 JA 生合成去調控下游的

*OsSUT4* 基因表現，因此 MeJA motif 在刻傷下的調控仍須進一步確認。

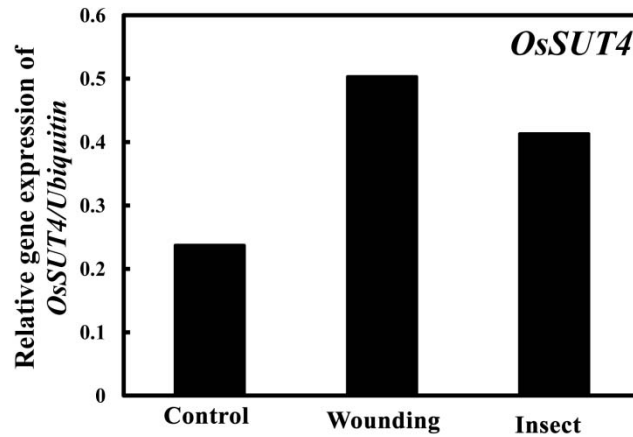
## 7. 結語與未來展望

本研究為了了解刻傷逆境下水稻對於 *OsSUT4* 促進表現的調控機制，和不同於一般機械性傷害的褐飛蝨危害對 SUT 的影響，及可能在啟動子上調控的區間，因此利用荷爾蒙的外加和生合成抑制劑的前處理偵測 *OsSUT4* 的基因表現，並以五個不同長度片段 *OsSUT4* 啟動子接上 *GUS* 報導基因來探討受刻傷後誘導 *OsSUT4* 的區間。結果顯示(圖十三): (1)機械性刻傷會促進 *OsSUT4* 基因表現及啟動子的活性;(2)斜紋夜盜蟲的咬食亦會提升 *OsSUT4* 的表現;(3)刺吸式口器—褐飛蝨對 *OsSUT4* 的基因表現為一個抑制作用;(4)刻傷主要會透由 JA 路徑去調控 *OsSUT4* 基因表現;(4)刻傷逆境所造成 *OsSUT4* 促進的現象， $H_2O_2$  亦會參與其中;(5)*OsSUT4* 受到刻傷的促進調控的啟動子區域在-248 仍有活性。

未來會進一步探討的問題有:(1)目前實驗室有 *pOsSUT4(-194/-11)* 和 *POsSUT4(-139/-11)* 片段轉植株，以更短片段的啟動子驅動 *GUS* 的轉植株，去找出刻傷調控的啟動子序列;(2)*OsSUT4* 在刻傷逆境下的功能;(3)褐飛蝨對於 *OsSUT4* 基因表現抑制作用的調控機制和對刺吸式昆蟲的關係;(4)刻傷誘導 *OsSUT4* 表現的組織。

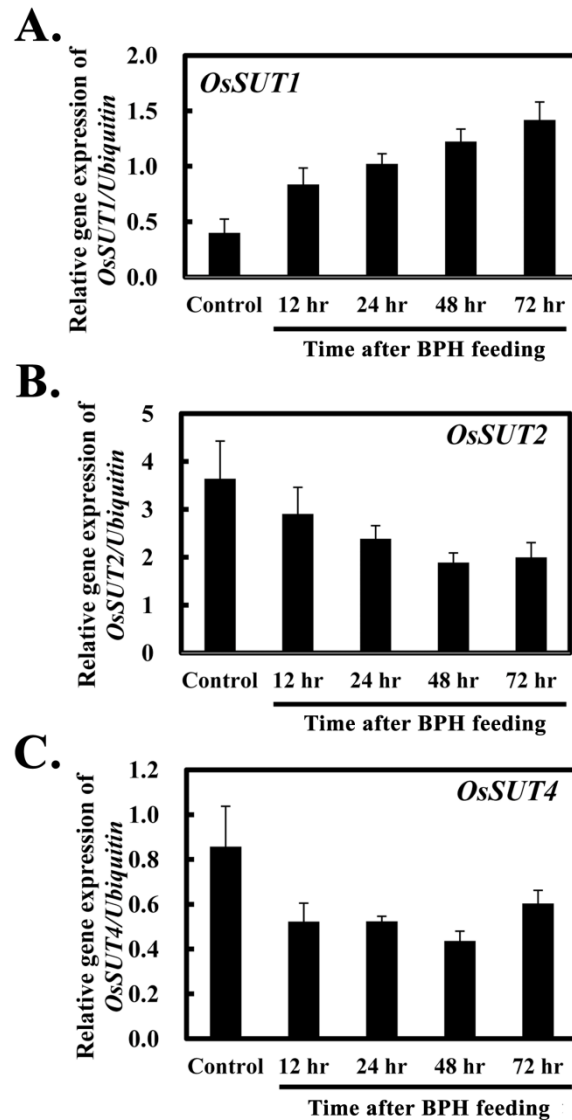


圖一、水稻三葉齡幼苗第三片葉受機械性刻傷後 *OsSUT4*、*OsCINI* 及 *OsMST6* 基因表現分析。以三葉齡水稻為材料，以剪刀對第三片葉身做機械性傷害。並利用 real-time RT-PCR 測定 *OsSUT4* 基因(A)、*OsCINI* 基因(B) 及 *OsMST6* 基因(C) 表現。Control 組為沒有處理刻傷材料。結果為獨立生物性和技術性三重複之平均值，誤差值以 standard error (S.E.) 表示。MST:monosaccharide transporter; CIN cell wall invertase。



圖二、水稻三葉齡幼苗受到機械性刻傷和夜盜蟲餵食處理之 *OsSUT4* 基因表現之比較分析。以水稻三葉齡為材料餵食夜盜蟲，密度為 10 隻/株，在餵食夜盜蟲 1 小時後收取材料，並利用 real-time RT-PCR 測定基因表現。結果為一重複。Control: 為沒有處理;Wounding: 為刻傷處理組;Insect: 夜盜蟲處理組。

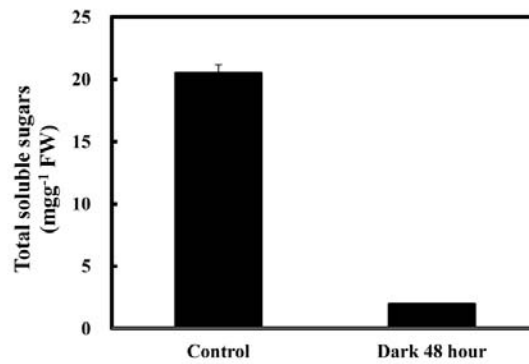




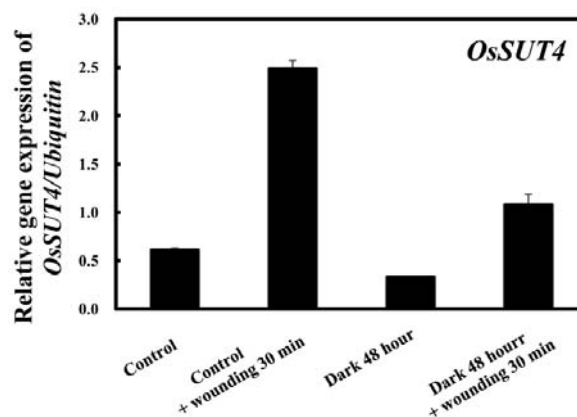
圖三、水稻三葉齡幼苗莖部經褐飛蝨餵食處理後 *OsSUT1*、*OsSUT2* 及 *OsSUT4* 基因之個別表現分析。以三葉齡水稻為材料餵食蟲齡為二~三齡之褐飛蝨(BPH)若蟲，密度為 8 隻/株。並利用 real-time RT-PCR 測定 *OsSUT1* 基因(A)、*OsSUT2* 基因(B)及 *OsSUT4* 基因(C)表現。結果為三重複之平均值，誤差值以 standard error (S.E.) 表示。Control: 為沒有褐飛蝨餵養處理; BPH: brown planthopper。



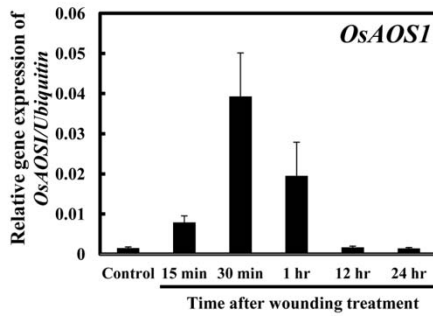
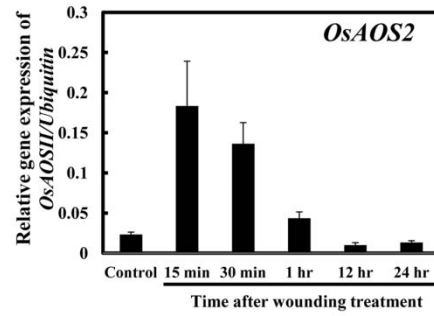
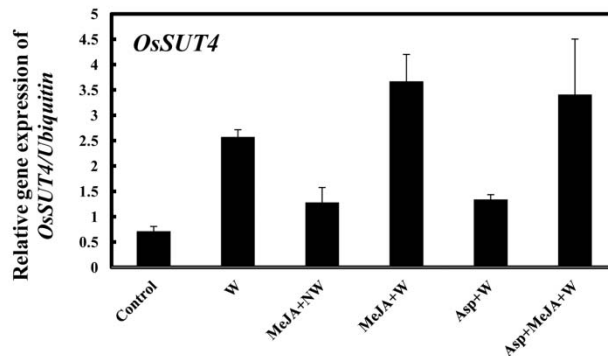
A.



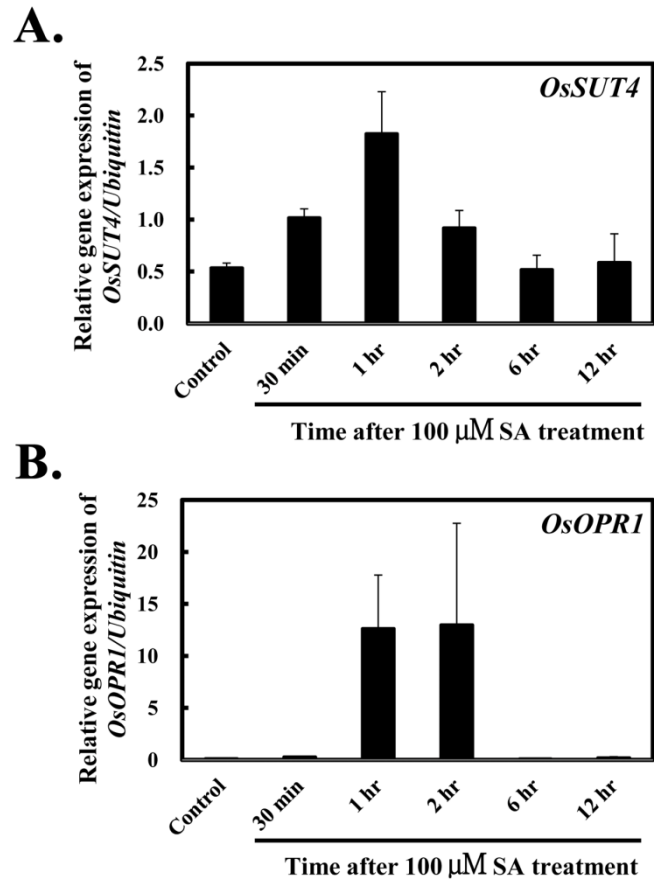
B.



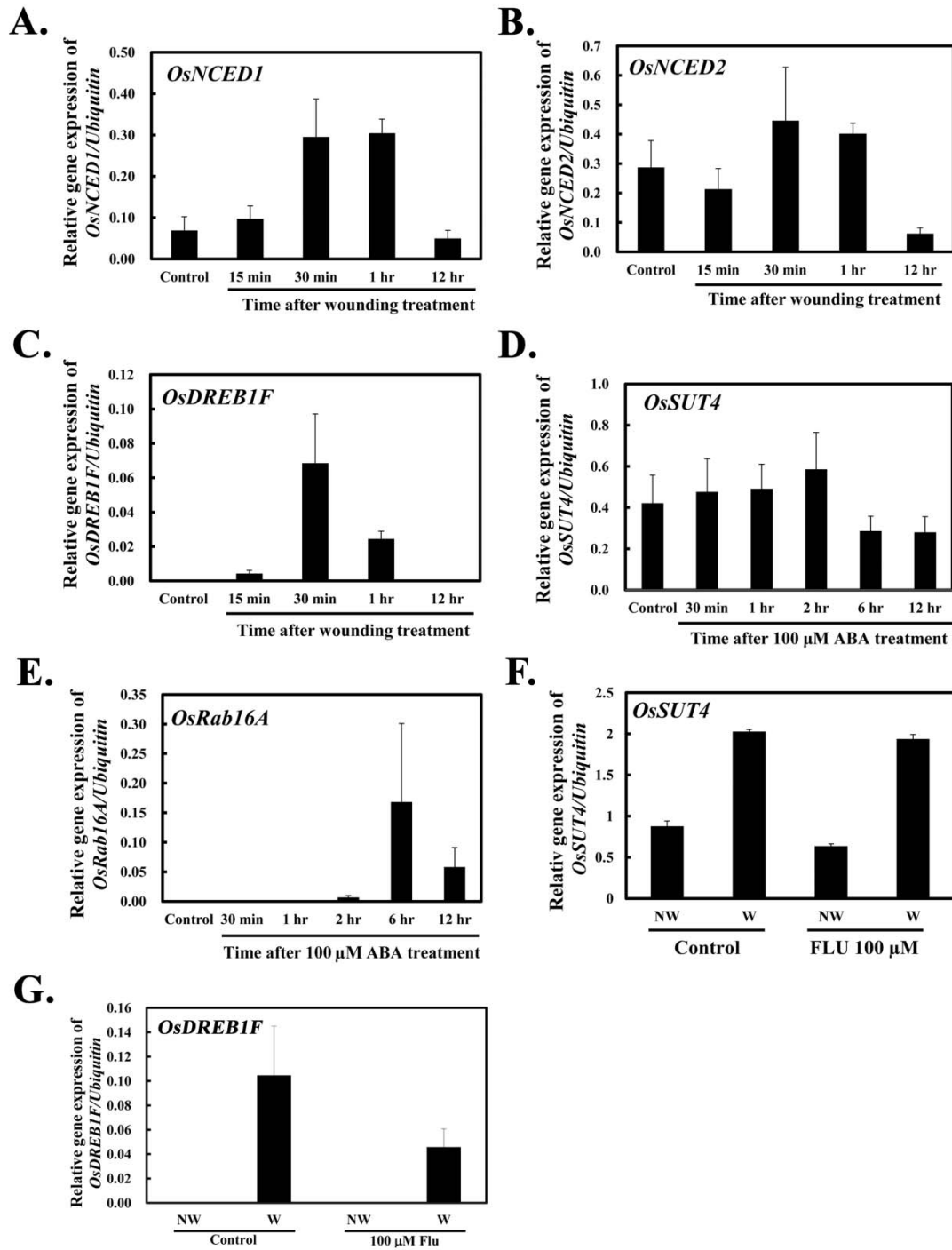
圖四、三葉齡水稻幼苗黑暗 48 小時總糖含量變化及黑暗 48 小時受到刻傷處理 30 分鐘後的 *OsSUT4* 基因表現。(A)正常光週下和黑暗處理 48 小時之後水稻第三片葉片之葉身的總可溶性糖含量。(B)正常光週期和黑暗處理 48 小時水稻植株，受刻傷逆境處理的 *OsSUT4* 基因表現。結果為三重複之平均值，誤差值以 standard error (S.E.) 表示。

**A.****B.****C.**

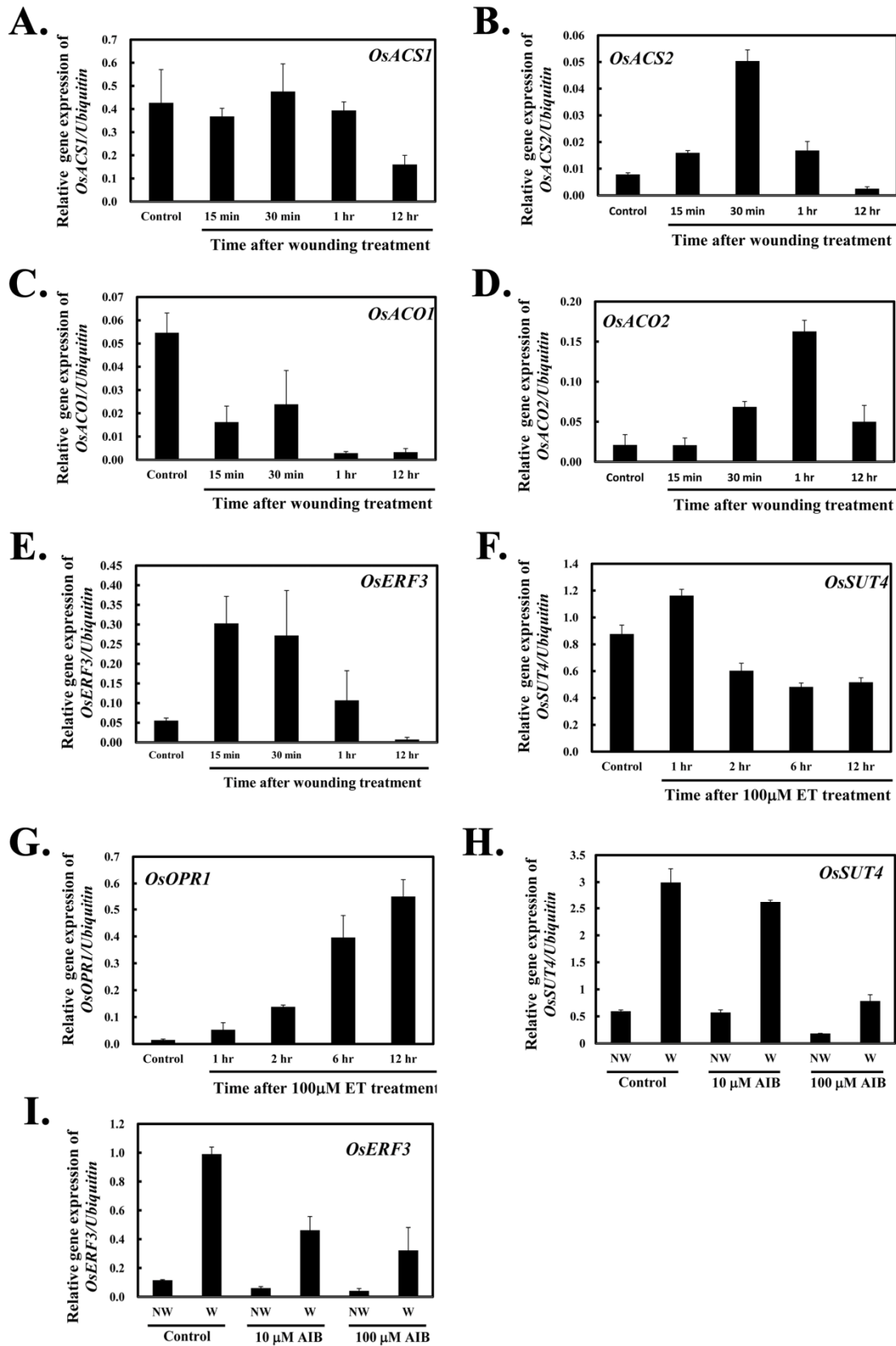
圖五、刻傷處理對 Jasmoante 生合成路徑基因表現、MeJA 對 *OsSUT4* 的基因和 Aspirin 前處理對刻傷誘導 *OsSUT4* 基因表現影響。並利用 real-time RT-PCR 測定受到刻傷後 *OsAOS1*(A)和 *OsAOS2*(B)隨著時間的基因表現變化。(C) 100  $\mu$ M MeJA 和外加刻傷對 30 分鐘後 *OsSUT4* 基因表現的影響、12 小時前處理 Aspirin 對刻傷誘導 *OsSUT4* 基因表現影響。Control 組為沒有刻傷和藥劑處理組。結果為三重複之平均值，誤差值以 standard error (S.E.) 表示。MeJA:Methyl Jasmonate ; NW:non-wounding;W:after wounding treatment;Asp:Aspirin。



圖六、SA 對於 *OsSUT4* 的影響。並利用 real-time RT-PCR 測定 SA 對 *OsSUT4* 基因表現的影響(A)100  $\mu$ M SA 對 *OsOPR1* 的影響(B)。Control 組為沒有 SA 處理。結果為三重複之平均值，誤差值以 standard error (S.E.) 表示。SA:Salicylic acid；NW:non-wounding;W:after wounding treatment。

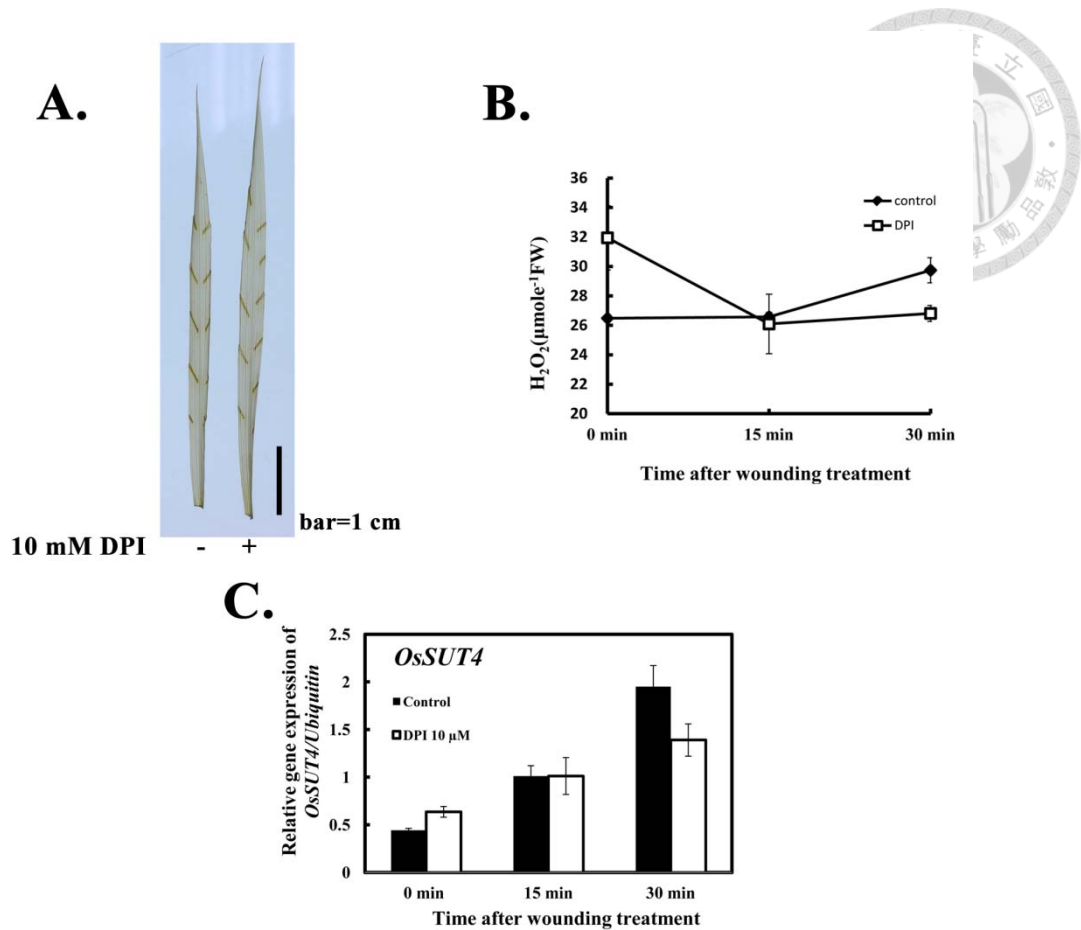


圖七、刻傷處理對 ABA 生合成路徑和反應基因的表現、ABA 對 *OsSUT4* 的基因影響和抑制劑前處理對刻傷誘導 *OsSUT4* 基因表現影響。利用 real-time RT-PCR 測定刻傷後 *OsNCED1* (A) 和 *OsNCED2* (B) 基因表現變化。刻傷後 ABA 反應基因 *OsDREB1F* (C) 基因表現變化。ABA 對 *OsSUT4* 基因表現的影響 (D)。ABA 對 ABA 反應基因 *OsRab16A* (E) 的影響。前處理 Fluridon 24 小時對 *OsSUT4* (F) 和 *OsDREB1F* (G) 刻傷誘導基因表現之影響。(A)(B)(C) Control 組為沒有刻傷逆境處理; (D)(E) Control 組為沒有 ABA 處理; (F)(G) Control 組為沒有前處理 Fluridon。結果為三重複之平均值，誤差值以 standard error (S.E.) 表示。ABA: Abscisic acid; NW: non-wounding; W: after wounding treatment; Flu: Fluridon。

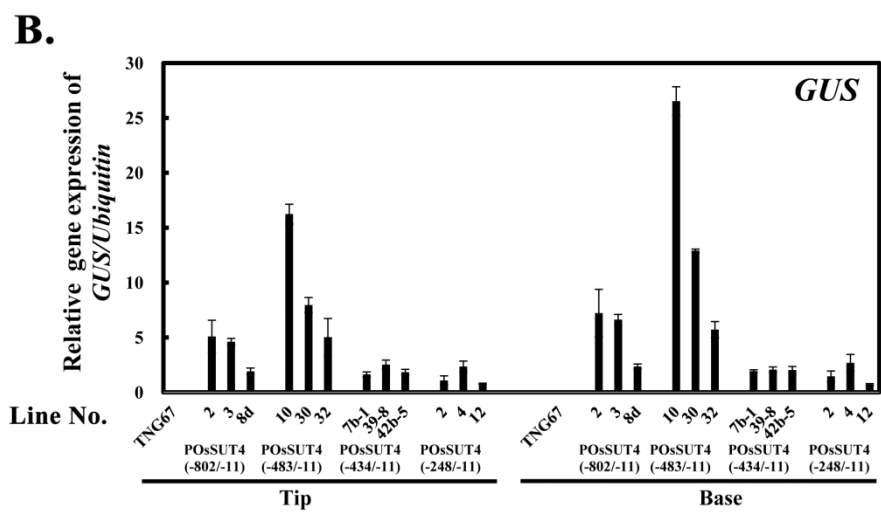
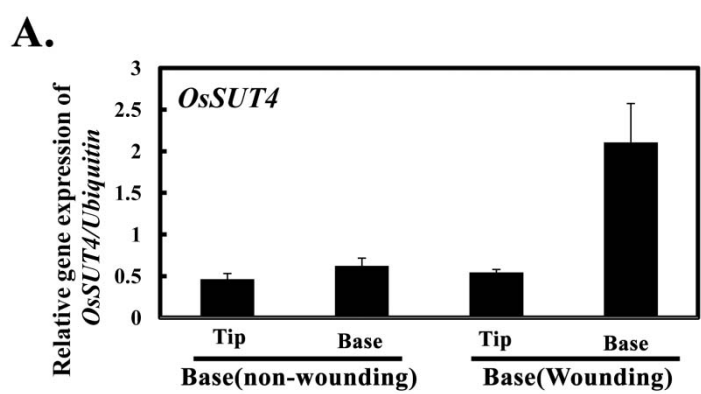


圖八、刻傷對乙烯生合成路徑和乙烯反應基因表現、Ethephon 對 *OsSUT4* 的基因影響和前處理乙烯生合成抑制劑對誘導 *OsSUT4* 基因表現影響。利用 real-time RT-PCR 測定刻傷後乙烯生合成基因 *OsACSI*(A)、*OsACS2*(B)、*OsACO1*(C)和 *OsACO2*(D)基因和乙烯反應基因 *OsERF3*(E)的表現變化。外加 ET 對 *OsSUT4*(F) 基因表現的影響。ET 對 *OsOPR1* 基因表現的影響(F)。前處理乙烯生合成抑制劑 AIB 對誘導 *OsSUT4*(H)和 *OsERF3*(I)。(A)(B)(C)(D)(E)Control 組為沒有刻傷處理;(F)(G)Control 組為沒有 ET 處理。(H)(I) Control 組為沒有 AIB 處理。結果均為三重複之平均值，誤差值以 standard error (S.E.) 表示。ET: Ethephon; NW:non-wounding; W: after wounding treatment; AIB: 2-Aminoisobutyric acid

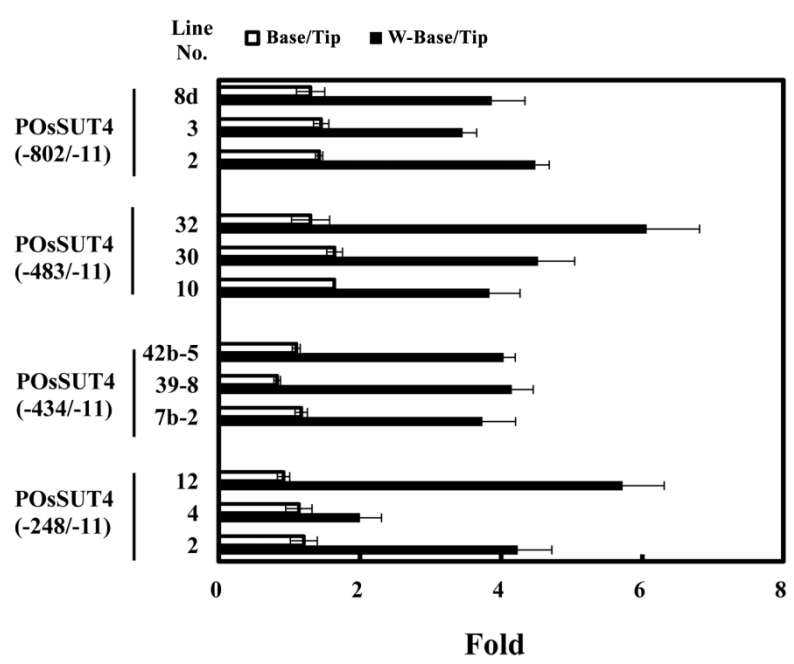




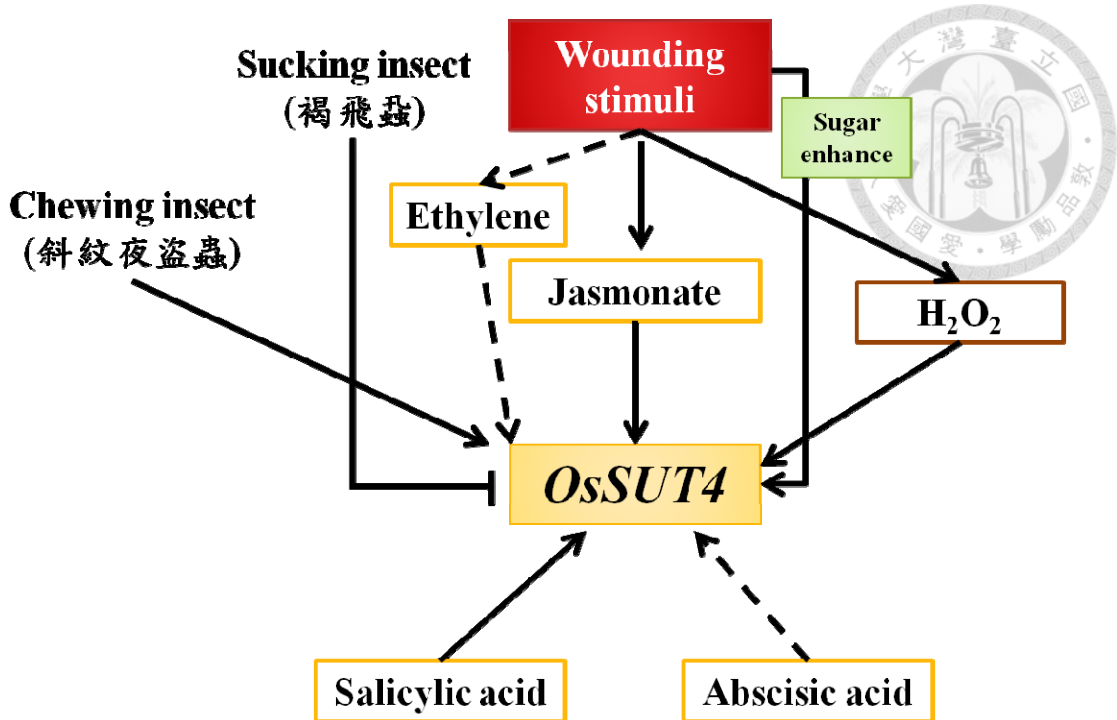
圖九、三葉齡水稻幼苗受刻傷時過氧化氫定性和定量及外加 NADPH oxidase 產生  $H_2O_2$  抑制劑-DPI 在刻傷逆境後  $H_2O_2$  定量及 *OsSUT4* 基因表現情形。(A)收取受到刻傷後 30 分鐘的第三片葉身，浸於 DAB 溶液中反應 12 小時，在取出後以 90%酒精，80°C 水浴中脫去葉綠素。(B)以四氯化鈦法測定有外加 DPI 及對照組中受刻傷逆境後 0、15 和 30 分鐘內生  $H_2O_2$  變化情形。(C)DPI 處理對於 *OsSUT4* 基因表現受刻傷誘導的影響。結果均為獨立試驗三重複之平均值，誤差值以 standard error (S.E.) 表示。DAB: Diaminobenzidine tetrahydrochloride；DPI: Diphenyleneiodonium chloride。



圖十、三葉齡水稻幼苗尖端(Tip)及基部端(Base)刻傷處理 *OsSUT4* 基因表現量差異，及不同片段不同 Line No. 尖端和基部 GUS 基因表現。 (A) 水稻第三片葉身 1/2 處將其分為尖端(Tip)及基部端(Base)，刻傷處理於基部端(Base)，偵測其 *OsSUT4* 基因表現量。 (B) 取 *POsSUT4*(-802/-11)、*POsSUT4*(-483/-11)、*POsSUT4*(-434/-11) 和 *POsSUT4*(-248/-11) 四個片段帶有 GUS 報導基因的轉植株，偵測其在尖端(Tip)及基部端(Base) GUS 基因表現量。結果均為三重複之平均值，誤差值以 standard error (S.E.) 表示。



圖十一、*OsSUT4* 啟動子 5'-deletion 片段 GUS 基因受刻傷誘導表現分析。以轉有 *OsSUT4* 基因不同長度啟動子 *POsSUT4*(-802/-11)、*POsSUT4*(-483/-11)、*POsSUT4*(-434/-11)及 *POsSUT4*(-248/-11)接上 GUS 報導基因的水稻轉殖株為材料，三葉齡時期處理刻傷逆境在葉身 1/2 基部處，和尖端處基因表現的誘導倍率。結果為三重複之平均值，誤差值以 standard error (S.E.) 表示。



圖十二、刻傷逆境調控 *OsSUT4* 基因表現示意圖。水稻葉受到刻傷後可能透由 JA 路徑和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的增加去誘導 *OsSUT4* 基因表現。試驗中糖類可增加刻傷誘導 *OsSUT4* 的表現。而斜紋夜盜蟲的啃咬和機械性刻傷會有相同誘導 *OsSUT4* 的基因表現，而褐飛蟲的調控機制則相反，會去抑制 *OsSUT4* 的基因表現。另外也可觀察到 SA 也會誘導 *OsSUT4* 的基因表現，ABA 只有些微誘導。

附表一、構築 *OsSUT4* 基因不同長度啟動子的引子列表。

引子名稱	Forward primer(5'→3')	Tm(°C)	限制酵素切位
F- <i>POsSUT4</i> (-802)- <i>SacI</i>	<u>GAGCTC</u> ATACAATCCAGGTG	51.8	<i>SacI</i>
F- <i>POsSUT4</i> (-483) - <i>SacI</i>	<u>GAGCTC</u> CAAACACGCATGAA	52	<i>SacI</i>
F- <i>POsSUT4</i> (-248) - <i>SacI</i>	<u>GAGCTC</u> CCGACCAACGCATCA	55.9	<i>SacI</i>

引子名稱	Reverse primer(5'→3')	Tm(°C)	限制酵素切位
R- <i>POsSUT4</i> (-11)- <i>SmaI</i>	<u>CCCGGG</u> GAGATCTGGTAGGGT	58	<i>SmaI</i>

附表二、real-time RT-PCR 之專一性引子。

Gene	Accession number	Forward primer(5'>3')	Tm(°C)	Amplicon size(bp)
		Reverse primer(5'>3')		
<i>OsSUT1</i>	D87819	CTGTGATTTTCCTGTCCCTG	58	136
		AACACTGCTAGTGGACCAGT	58	
<i>OsSUT2</i>	AB091672	AGGAGGAGAGGTCACCGATAA	58	240
		CCAACATCCAATGTACAACAGCA	58	
<i>OsSUT4</i>	AB091673	TTTGGCTGAGCAGAACACCA	58	249
		ATGTCATTCGGGCAGAGCTT	58	
<i>OsCIN1</i>	AT342319	ACCGACCCTACCAAGTCTTC	56.2	269
		TTCTTCATTTCCCACGCTTTC	53.6	
<i>OsMST6</i>	AY342322	AAGCTCGCCAACCTGATGACC	53.8	228
		ATCCCCAAGTAGAGTATCCG	51.8	
<i>OsAOS1</i>	AB116527	TGGAGCTAGTAGCTAGCTCG	53.8	98
		GCGACGCGAACGAGATGCAA	55.9	
<i>OsAOS2</i>	AY310358	TTCAACCTCCGCCGTCAATC	53.8	133
		GCCATGCAAGAATTCAGGTACG	54.8	
<i>OsOPR1</i>	AB040743	ATCAGATTATCGCCGTTCG	49	253
		CAGCCACCACCTTGTTC	53	
<i>OsNCED1</i>	AY838897	AGCCTCGGTCTTCCAATTTT	49.7	125
		CACCCAACACAAAAGCTACG	51.8	
<i>OsNCED2</i>	AY838898	TCATTCCAAAACACCTTCCA	47.7	113
		TCCGGGGACCTCCTATGTAT	53.8	
<i>OsDREB1F</i>	AY785897	AGGACGCCATCTTCGACAT	51.1	106
		GTCGAGAGATCTCCAATCG	53.8	
<i>OsRab16A</i>	AK121952	CGACACACCACCACCATG	55.9	294
		TGTGTACATATGCACGATGA	47.7	
<i>OsACS1</i>	AK071011	GATTGATTCGATCGGCTGTT	49.7	235
		GTCGAACGACAGCTGGTTCT	53.8	
<i>OsACS2</i>	AK064250	TTTTCTTGTGGGGGTCTGTC	51.8	161
		TTCGTCGAGAGAAGGTCGAT	51.8	

附表二、接續上頁

Gene	Accession number	Forward primer(5'>3')	Tm(°C)	Amplicon size(bp)
		Reverse primer(5'>3')		
<i>OsACO1</i>	AK065039	TCGACATGAGTCTGCTCGAC	53.8	157
		CGCTTGTAGTGGTCCTTGGT	53.8	
<i>OsACO2</i>	AK058296	TGTGTGTGCATGAACTGTGG	51.8	199
		TTGCTATGACACGGATCGAA	49.7	
<i>GUS</i>		ATTGATCAGCGTTGGTGGGA	51.8	208
		CCCACACTTTGCCGTAATG	51	
<i>Ubiquitin</i>	D12629	CGCAAGTACAACCAGGACAA	52	101
		TGGTTGCTGTGACCACACTT	52	
<i>OsERF3</i>	AB036883.1	GGTCGCTTTCCTTTCAGAGGA	54.4	214
		TTGTTCGCCGTAACCGCTGGA	56.3	

附表三、木村氏水耕液配方。(Chu and Lee, 1989)

<b>A Stock solution (500X, 1L)</b>	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	24.1 g
KNO <sub>3</sub>	9.25 g
MgSO <sub>4</sub> or MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	33.0 g or 67.5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	12.4 g
<b>B Stock solution (500X, 1L)</b>	
Fe-citrate	7.5 g (需要加熱溶解)
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> or Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	30 g or 43.1 g
12 N HCl	41.67 mL
<b>C Stock solution (1000X, 1L)</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.155 g
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0.034 g
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.058 g
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.013 g
H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> or MoO <sub>3</sub>	0.008 g or 0.007 g

取 1 L 蒸餾水分別加入 StockA、B 和 C 的溶液 1 ml，將 pH 值調至 4.6~4.8，即為水稻水耕培養的水耕液。



附表四、水稻轉殖相關培養基。(台大農化系洪傳楊老師實驗室提供)



YEP medium	含量
bactopeptone	10 g/L
yeast extract	10 g/L
sodium chloride	5 g/L
agar	15 g/L

AB medium		並分別取 50 mL 的 BufferA 和 B, 和 50 g Glucose 加水定到 1 L
<b>20X BufferA</b>	含量	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	60 g/L	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 g/L	
<b>20X BufferB</b>	含量	
NH <sub>4</sub> Cl	20 g/L	
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	6 g/L	
KCl	3 g/L	
CaCl <sub>2</sub>	0.2 g/L	
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.05 g/L	

Callus induction medium(CIM)	含量
N6 salts(含 vitamins)*	3.95 g/L
Sucrose	30 g/L
Casamino acid	1 g/L
2,4-D	2 mg/L
Phytigel	3 g/L
Proline	2.8 g/L

pH5.7

CIM-CH medium 為含有 250 mg/L Cefotaxime 和 50 mg/Lhygromycine



<b>2N6-AS medium</b>	含量
N6 salts(含 vitamins)*	3.95 g/L
Sucrose	30 g/L
Casamino acid	1 g/L
2,4-D	2 mg/L
Phytigel	3 g/L
Glucose	10 g/L
Acetosyringone	200 $\mu$ M

pH5.2

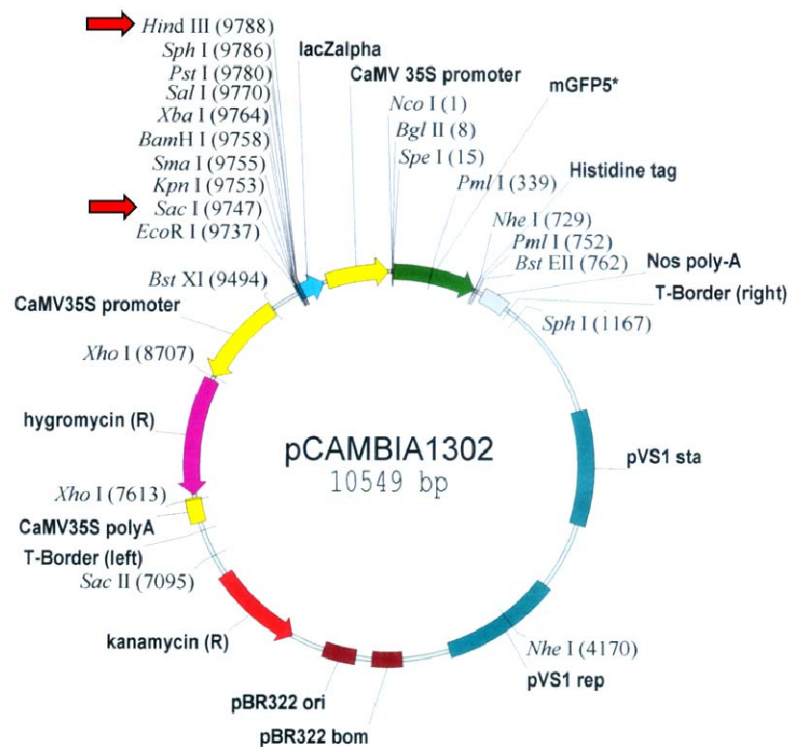
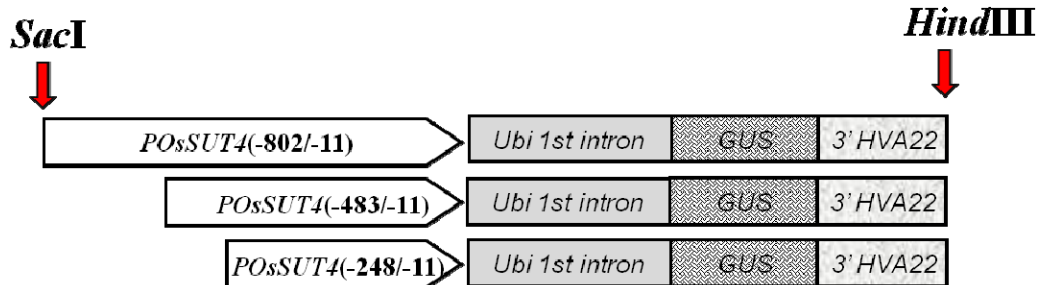
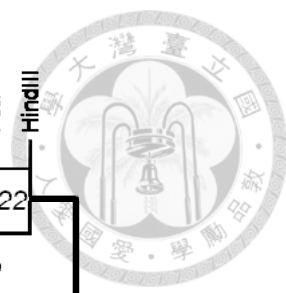
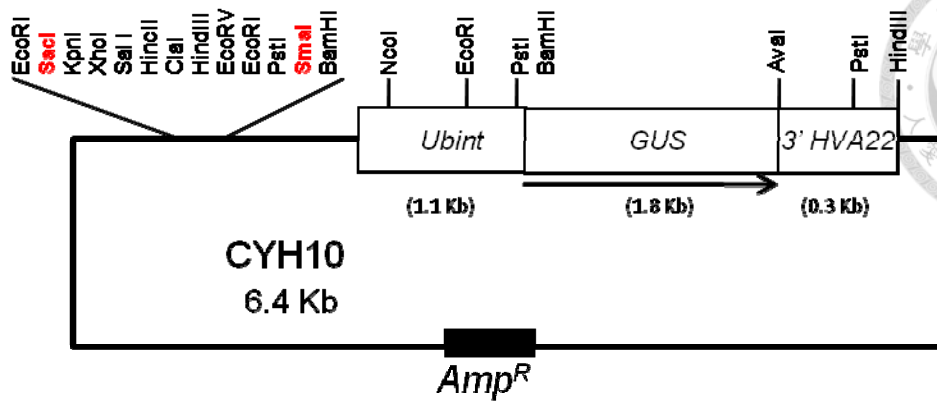
<b>Regeneration medium</b>	含量
N6 salts(含 vitamins)*	3.95 g/L
Sucrose	30 g/L
Casamino acid	1 g/L
Phytigel	4 g/L
NAA	0.5 mg/L
Kinetin	5 mg/L

pH5.7

<b>Root induction medium</b>	含量
MS salts(含 vitamins)*	4.4 g/L
Sucrose	30 g/L
Phytigel	3 g/L

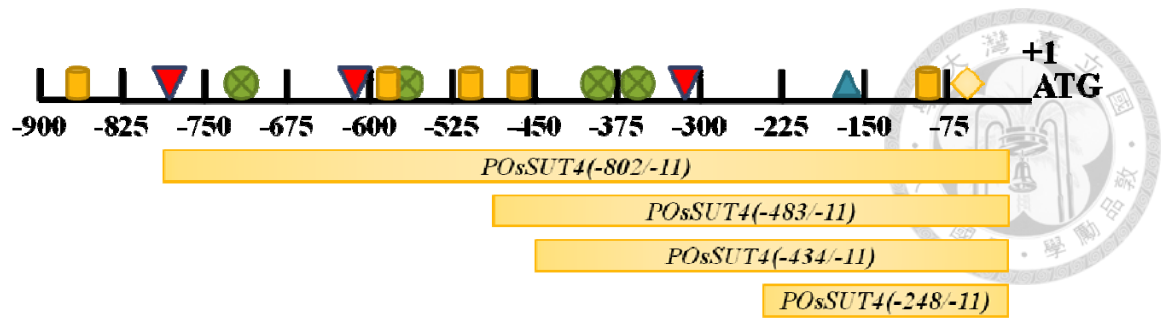
pH5.7

\*\*N6 salts(含 vitamins)和 MS salts(含 vitamins)為 Duchefa Biochemie 出產的混合粉末。



附圖一、穩定性表現系統構築所使用的載體

*OsSUT4* 啟動子以 *SacI* 和 *SmaI* 接入 CYH10(台大農化系洪傳揚老師提供)，再以 *SacI* 和 *HindIII* 接入農桿菌轉殖的表現載體 pCambia1302 中，並利用農桿菌轉殖方法建立不同 *OsSUT4* 啟動子片段接有 *GUS* 報導基因的轉植水稻。

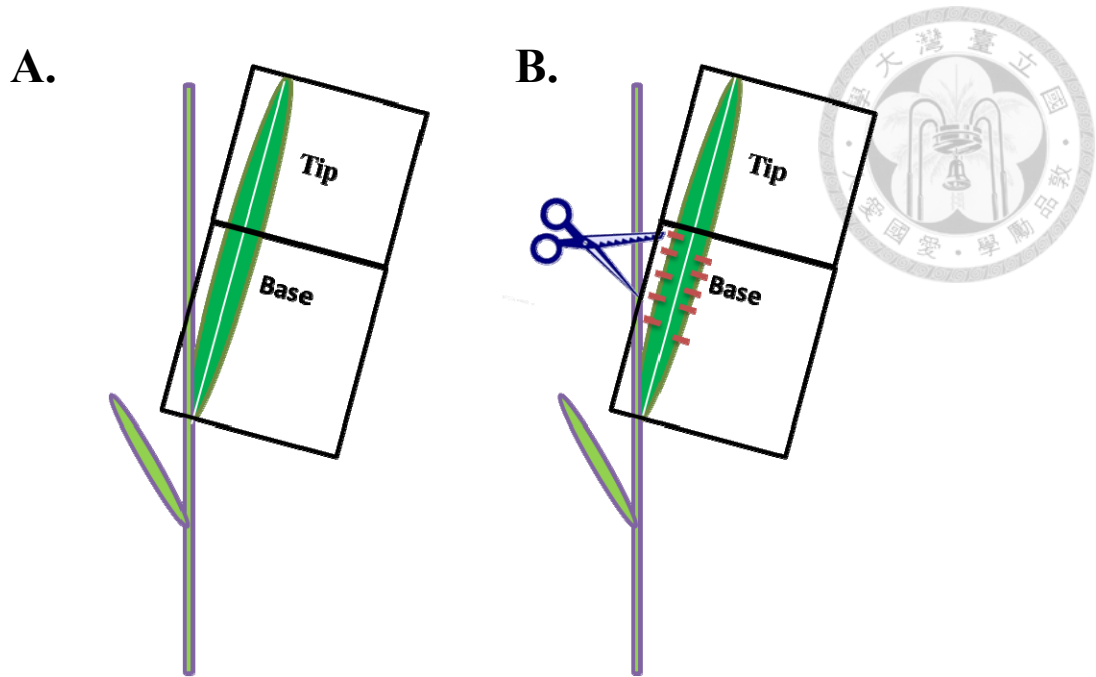


Symbol	Cis-acting elements	Function
	ABRE	Abscisic acid responsive element; a cis-acting regulatory element involved in <b>abscisic acid</b> responsiveness
	MYC	Cis-acting regulatory element involved in early response to drought and <b>abscisic acid</b> induction
	W-box	Cis-acting regulatory element involved in direct fungal elicitor stimulated transcription of defense genes and activation of genes involved in response to <b>wounding</b>
	Me-JA motif	Cis-acting regulatory element involved in <b>methyl jasmonates</b> responsiveness
	GT-1	Cis-acting regulatory element required for rapid response to <b>pathogen</b> attack, salinity and <b>salicylic acid</b> inducible gene expression

## 附圖二、OsSUT4 啟動子上受刻傷、ABA、JA、SA 調控的 cis-acting element

Ibraheem 等人(2010)根據現有資料庫 Plant CARE、PLACE、Genomatix

Matinspector professional 分析之結果。



附圖三、轉植株水稻啟動子活性分析刻傷處理示意圖。將第三片葉身分為尖端(Tip)和基部(Base)(A)，刻傷處理組處理於葉身基部(B)。

## 參考文獻

- 李金龍 (2002) 植物保護圖鑑系列 8-水稻保護。行政院農業委員會動植物防疫檢疫局。
- 高景輝 (2005) 植物生理分析技術。五南圖書出版股份有限公司。
- 曾東海、鄭清煥、陳治官、顏信沫、鄭統隆、卓緯玄、王強生(2003) 水稻台農 67 號突變品系對褐飛蟲之反應及抗性遺傳之探討。植物保護學會會刊 43:211-223
- 陳佳宜 (2007) 水稻種子發芽時期胚中蔗糖轉運蛋白基因之表現調控機制。國立台灣大學生物資源暨農學院系碩士論文。
- 陳懷如 (2009) 水稻葉鞘在抽穗期間由儲存組織轉換成供源組織之分子調控機制。國立台灣大學生物資源暨農學院系博士論文。
- 蕭惠心 (2011) 水稻蔗糖轉運蛋白質基因 *OsSUT2* 及 *OsSUT4* 之表現分析。國立台灣大學生物資源暨農學院系碩士論文。
- Aoki N, Hirose T, Furbank RT (2012) Sucrose transport in higher plants: from source to sink. *Photosynthesis* 34:703-729.
- Aoki N, Hirose T, Scofield GN, Whitfeld PR, Furbank RT (2003) The sucrose transporter gene family in rice. *Plant and Cell Physiology* 44:223-232.
- Arnold TM, Schultz JC (2002) Induced sink strength as a prerequisite for induced tannin biosynthesis in developing leaves of *Populus*. *Oecologia* 130:585-593.
- Baldwin IT, Zhang ZP, Diab N, Ohnmeiss TE, McCloud ES, Lynds GY, Schmelz EA (1997) Quantification, correlations and manipulations of wound-induced changes in jasmonic acid and nicotine in *Nicotiana sylvestris*. *Planta* 201:397-404.
- Boller T, Kende H (1980) Regulation of wound ethylene synthesis in plants. *Nature* 286:259-260.
- Braun DM, Slewinski TL (2009) Genetic control of carbon partitioning in grasses: roles of sucrose transporters and tie-dyed loci in phloem loading. *Plant Physiology* 149:71-81.
- Bürkle L, Hibberd JM, Quick WP, Kühn C, Hirner B, Frommer WB (1998) The H<sup>+</sup>-sucrose cotransporter NtSUT1 is essential for sugar export from tobacco leaves. *Plant Physiology* 118:59-68.
- Chen HJ, Wang SJ (2008) Molecular regulation of sink–source transition in rice leaf sheaths during the heading period. *Acta Physiologiae Plantarum* 30:639-649.
- Chen HJ, Wang SJ (2012) Abscisic acid enhances starch degradation and sugar transport in rice upper leaf sheaths at the post-heading stage. *Acta Physiologiae Plantarum* 34:1493-1500.
- Chen Z, Silva H, Klessig DF (1993) Active oxygen species in the induction of plant

- systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262:1883-1885.
- Chen JY, Liu SL, Siao W, Wang SJ** (2010) Hormone and sugar effects on rice sucrose transporter *OsSUT1* expression in germinating embryos. *Acta Physiologiae Plantarum* 32:749-756.
- Cheng WH, Taliercio EW, Chourey PS** (1996) The *Miniature1* seed locus of maize encodes a cell wall invertase required for normal development of endosperm and maternal cells in the pedicel. *The Plant Cell* 8: 971-983.
- Chincinska IA, Liesche J, Krügel U, Michalska J, Geigenberger P, Grimm B, Kühn C** (2008) Sucrose transporter StSUT4 from potato affects flowering, tuberization, and shade avoidance response. *Plant Physiology* 146:515-528.
- Chu, C, Lee, T M** (1989) The relationship between ethylene biosynthesis and chilling tolerance in seedlings of rice (*Oryza sativa*). *Botanical Bulletin Academia Sinica* 30:263-273.
- Delessert C, Wilson I, Van Der Straeten D, Dennis E, Dolferus R** (2004) Spatial and temporal analysis of the local response to wounding in *Arabidopsis* leaves. *Plant Molecular Biology* 55:165-181.
- Doares SH, Javier NV, Antonio C, Clarence AR** (1995) Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid. *Plant Physiology* 108: 1741-1 746.
- Eom JS, Cho JI, Reinders A, Lee SW, Yoo Y, Tuan PQ, Choi SB, Bang B, Park YI, Cho MH, Bhoo SH, An G, Hahn TR, Ward JM, Jeon JS** (2011) Impaired function of the tonoplast-localized sucrose transporter in rice, *OsSUT2*, limits the transport of vacuolar reserve sucrose and affects plant growth. *Plant Physiology* 157:109-119.
- Erb M, Meldau S, Howe GA** (2012) Role of phytohormones in insect-specific plant reactions. *Trends in Plant Science* 17(5): 250-259.
- Fotopoulos V, Gilbert MJ, Pittman JK, Marvier AC, Buchanan AJ, Sauer N, Hall JL, Williams LE** (2003) The monosaccharide transporter gene, *AtSTP4*, and the cell-wall invertase, *Atβfruct1*, are induced in *Arabidopsis* during infection with the fungal biotroph *Erysiphe cichoracearum*. *Plant Physiology* 132:821-829.
- Guo B, Liang YC, Zhu YG, Zhao FJ** (2007) Role of salicylic acid in alleviating oxidative damage in rice roots (*Oryza sativa*) subjected to cadmium stress. *Environmental Pollution* 147:743-749.
- Hackel A, Schauer N, Carrari F, Fernie AR, Grimm B, Kuhn C** (2006) Sucrose transporter LeSUT1 and LeSUT2 inhibition affects tomato fruit development in different ways. *The Plant Journal* 45:180-192.
- Hanik N, Gomez S, Best M, Schueller M, Orians CM, Ferrieri RA** (2010)

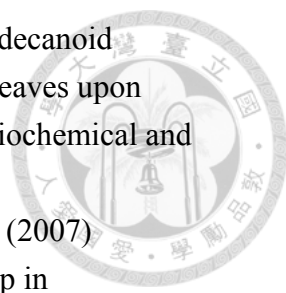
Partitioning of new carbon as  $^{13}\text{C}$  in *Nicotiana tabacum* reveals insight into methyl jasmonate induced changes in metabolism. *Journal of Chemical Ecology* 36:1058-1067.

- Hirose T, Takano M, Terao T** (2002) Cell wall invertase in developing rice caryopsis: molecular cloning of *OsCINI* and analysis of its expression in relation to its role in grain filling. *Plant and Cell Physiology* 43:452-459.
- Hirose T, Imaizumi N, Scofield GN, Furbank RT, Ohsugi R** (1997) cDNA cloning and tissue specific expression of a gene for sucrose transporter from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant and Cell Physiology* 38:1389-1396.
- Hogenhout SA, Bos JI** (2011) Effector proteins that modulate plant--insect interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 14:422-428.
- Hong CY, Chao YY, Yang MY, Cheng SY, Cho SC, Kao CH** (2009) NaCl-induced expression of glutathione reductase in roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings is mediated through hydrogen peroxide but not abscisic acid. *Plant and Soil* 320:103-115.
- Howe GA, Jander G** (2008) Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology* 59:41-66.
- Huang X, Stettmaier K, Michel C, Hutzler P, Mueller MJ, Durner J** (2004) Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 218: 938-946.
- Ibraheem O, Hove RM, Bradley G** (2008) Sucrose assimilation and the role of sucrose transporters in plant wound response. *African Journal of Biotechnology* 7:4850-4855.
- Ibraheem O, Botha CE, Bradley G** (2010) In silico analysis of cis-acting regulatory elements in 5' regulatory regions of sucrose transporter gene families in rice (*Oryza sativa* Japonica) and *Arabidopsis thaliana*. *Computational Biology and Chemistry* 34:268-283.
- Jefferson RA** (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter* 5: 387-405
- Johnson R, Ryan CA** (1990) Wound-inducible potato inhibitor II genes: enhancement of expression by sucrose. *Plant Molecular Biology* 14:527-536.
- Khattab H** (2007) The defense mechanism of cabbage plant against phloem-sucking aphid (*Brevicoryne brassicae* L.). *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 1: 56-62, 2007.
- Kim SR, Costa MA, An G** (1991) Sugar response element enhances wound response of potato proteinase inhibitor II promoter in transgenic tobacco. *Plant Molecular Biology* 17:973-983.
- Koo AJ, Howe GA** (2009) The wound hormone jasmonate. *Phytochemistry*



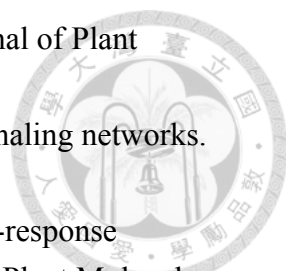
70:1571-1580.

- López-Gálvez G, Saltveit M, Cantwell M** (1996) Wound-induced phenylalanine ammonia lyase activity: factors affecting its induction and correlation with the quality of minimally processed lettuces. *Postharvest Biology and Technology* 9:223-233.
- Meyer S, Lauterbach C, Niedermeier M, Barth I, Sjolund RD, Sauer N** (2004) Wounding enhances expression of *AtSUC3*, a sucrose transporter from *Arabidopsis* sieve elements and sink tissues. *Plant Physiology* 134:684-693.
- Mur LAJ, Naylor G, Warner SAJ, Sugars JM, White RF, Draper J** (1996) Salicylic acid potentiates defence gene expression in tissue exhibiting acquired resistance to pathogen attack. *The Plant Journal* 9:559-571.
- Musser RO, Hum-Musser SM, Eichenseer H, Peiffer M, Ervin G, Murphy JB, Felton GW** (2002) Herbivory: caterpillar saliva beats plant defences. *Nature* 416:599-560.
- Nojiri H, Sugimori M, Yamane H, Nishimura Y, Yamada A, Shibuya N, Kodama O, Murofushi N, Omori T** (1996) Involvement of jasmonic acid in elicitor-induced phytoalexin production in suspension-cultured rice cells. *Plant Physiology* 110:387-392.
- Onkokesung N, Galis I, von Dahl CC, Matsuoka K, Saluz HP, Baldwin IT** (2010) Jasmonic acid and ethylene modulate local responses to wounding and simulated herbivory in *Nicotiana attenuata* leaves. *Plant Physiology* 153:785-798.
- Orozco-Cárdenas M, Ryan CA** (1999) Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96:6553-6557.
- Orozco-Cárdenas M, Narváez-Vásquez J, Ryan CA** (2001) Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *The Plant Cell* 13:179-191.
- Pēna-Cortés H, Sánchez-Serrano JJ, Mertens R, Willmitzer L, Prat S** (1989) Abscisic acid is involved in the wound-induced expression of the proteinase inhibitor II gene in potato and tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86:9851-9855.
- Pēna-Cortés H, Albrecht T, Prat S, Weiler EW, Willmitzer L** (1993) Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. *Planta* 191:123-128.
- Quilliam RS, Swarbrick PJ, Scholes JD, Rolfe SA** (2006) Imaging photosynthesis in wounded leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 57:55-69.

- 
- Rakwal R, Tamogami S, Agrawal GK, Iwahashia H** (2002) Octadecanoid signaling componen "burst" in rice (*Oryza sativa* L.) seedling leaves upon wounding by cut and treatment with fungal elicitor chitosan. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 295:1041-1045.
- Ralph SG, Hudgins JW, Jancsik S, Franceschi VR, Bohlmann J** (2007) Aminocyclopropane carboxylic acid synthase is a regulated step in ethylene-dependent induced conifer defense. Full-length cDNA cloning of a multigene family, differential constitutive, and wound- and insect-induced expression, and cellular and subcellular localization in spruce and douglas fir. *Plant Physiology* 143:410-424.
- Ralph SG, Yueh H, Friedmann M, Aeschliman D, Zeznik JA, Nelson CC, Butterfield YSN, Kirkpatrick R, Liu J, Jones SJM, Marra MA, Douglas CJ, Ritland K, Bohlmann J** (2006) Conifer defence against insects: microarray gene expression profiling of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) induced by mechanical wounding or feeding by spruce budworms (*Choristoneura occidentalis*) or white pine weevils (*Pissodes strobi*) reveals large-scale changes of the host transcriptome. *Plant, Cell and Environment* 29:1545-1570.
- Reymond P, Weber H, Damond M, Farmer EE** (2000) Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 12:707-719.
- Rosenkranz H, Vogel R, Greiner S, Rausch T** (2001) In wounded sugar beet (*Beta vulgaris* L.) tap-root, hexose accumulation correlates with the induction of a vacuolar invertase isoform. *Journal of Experimental Botany* 52:2381-2385.
- Sadka A, DeWald DB, May GD, Park WD, Mullet JE** (1994) Phosphate modulates transcription of soybean *VspB* and other sugar-inducible genes. *The Plant Cell* 6:737-749.
- Schafer M, Christine F, Ian TB, Stefan M** (2011) Grasshopper oral secretions increase salicylic acid and abscic acid levels in wounded leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior* 6:9 1256-1258
- Schwachtje J, Minchin PE, Jahnke S, van Dongen JT, Schittko U, Baldwin IT** (2006) SNF1-related kinases allow plants to tolerate herbivory by allocating carbon to roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103:12935-12940.
- Scofield GN, Hirose T, Gaudron JA, Furbank RT, Upadhyaya NM, Ohsugi R** (2002) Antisense suppression of the rice transporter gene, *OsSUT1*, leads to impaired grain filling and germination but does not affect photosynthesis. *Functional Plant Biology* 29:815-826.
- Scofield GN, Aoki N, Hirose T, Takano M, Jenkins CL, Furbank RT** (2007) The

role of the sucrose transporter, OsSUT1, in germination and early seedling growth and development of rice plants. *Journal of Experimental Botany* 58:483-495.

- Sherson S, Alford H, Forbes S, Wallace G, Smith S** (2003) Roles of cell-wall invertases and monosaccharide transporters in the growth and development of *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 54: 525-531.
- Shiratake K** (2007) Genetics of sucrose transporter in plants. *Genes Genomes Genomics* 1:73-80.
- Shivaji R, Camas A, Ankala A, Engelberth J, Tumlinson JH, Williams WP, Wilkinson JR, Luthe DS** (2010) Plants on constant alert: elevated levels of jasmonic acid and jasmonate-induced transcripts in caterpillar-resistant maize. *Journal of Chemical Ecology* 36:179-191.
- Siao W, Chen JY, Hsiao HH, Chung P, Wang SJ** (2011) Characterization of *OsSUT2* expression and regulation in germinating embryos of rice seeds. *Rice* 4:39-49.
- Singer SD, Hily JM, Cox KD** (2011) The sucrose synthase-1 promoter from *Citrus sinensis* directs expression of the beta-glucuronidase reporter gene in phloem tissue and in response to wounding in transgenic plants. *Planta* 234:623-637.
- Smeekens S, Ma J, Hanson J, Rolland F** (2010) Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Current Opinion in Plant Biology* 13:274-279.
- Sun AJ, Xu HL, Gong WK, Zhai HL, Meng K, Wang YQ, Wei XL, Xiao GF, Zhu Z** (2008) Cloning and expression analysis of rice sucrose transporter genes *OsSUT2M* and *OsSUT5Z*. *Journal of Integrative Plant Biology* 50:62-75.
- Suttle JC, Lulai EC, Huckle LL, Neubauer JD** (2013) Wounding of potato tubers induces increases in ABA biosynthesis and catabolism and alters expression of ABA metabolic genes. *Journal of Plant Physiology* 170:560-566.
- Tang G, Lüscher M, Sturm A** (1999) Antisense repression of vacuolar and cell wall invertase in transgenic carrot alters early plant development and sucrose partitioning. *The Plant Cell* 11: 177-189.
- Tian D, Peiffer M, Shoemaker E, Tooker J, Haubruge E, Francis F, Luthe DS, Felton GW** (2012) Salivary glucose oxidase from caterpillars mediates the induction of rapid and delayed-induced defenses in the tomato plant. *PLoS one* 7:e36168.
- Truernit E, Schmid J, Epple P, Illig J, Sauer N** (1996) The sink-specific and stress-regulated *Arabidopsis STP4* gene: enhanced expression of a gene encoding a monosaccharide transporter by wounding, elicitors, and pathogen challenge. *The Plant Cell* 8:2169-2182.

- 
- Walling LL** (2000) The myriad plant responses to herbivores. *Journal of Plant Growth Regulation* 19:195-216.
- Wang KLC, Li H, Ecker JR** (2002) Ethylene biosynthesis and signaling networks. *The Plant Cell* 14:s131-s151.
- Wang SJ, Lan YC, Chen SF, Chen YM, Yeh KW** (2002) Wound-response regulation of the sweet potato *sporamin* gene promoter region. *Plant Molecular Biology* 48: 223–231.
- Wang Q, Guan Y, Wu Y, Chen H, Chen F, Chu C** (2008) Overexpression of a rice *OsDREB1F* gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both *Arabidopsis* and rice. *Plant Molecular Biology* 67:589-602.
- Wang X, Sager R, Cui W, Zhang C, Lu H, Lee JY** (2013) Salicylic acid regulates plasmodesmata closure during Innate Immune responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* tpc.113.110676.
- Wang Y, Xiao Y, Zhang Y, Chai C, Wei G, Wei X, Xu H, Wang M, Ouwerkerk PB, Zhu Z** (2008) Molecular cloning, functional characterization and expression analysis of a novel monosaccharide transporter gene *OsMST6* from rice (*Oryza sativa* L.). *Planta* 228:525-535.
- Will T, Tjallingii WF, Thonnessen A, van Bel AJ** (2007) Molecular sabotage of plant defense by aphid saliva. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104:10536-10541.
- Yang Y, Qi M, Mei C** (2004) Endogenous salicylic acid protects rice plants from oxidative damage caused by aging as well as biotic and abiotic stress. *The Plant Journal* 40:909-919.
- Zarate SI, Kempema LA, Walling LL** (2007) Silverleaf whitefly induces salicylic acid defenses and suppresses effectual jasmonic acid defenses. *Plant Physiology* 143:866-875.
- Zhang L, Cohn NS, Mitchell JP** (1996) Induction of a pea cell-wall invertase gene by wounding and its localized expression in phloem. *Plant Physiology* 112:1111-1117.
- Zhang F, Zhu L, He G** (2004) Differential gene expression in response to brown planthopper feeding in rice. *Journal of Plant Physiology* 161:53-62.