

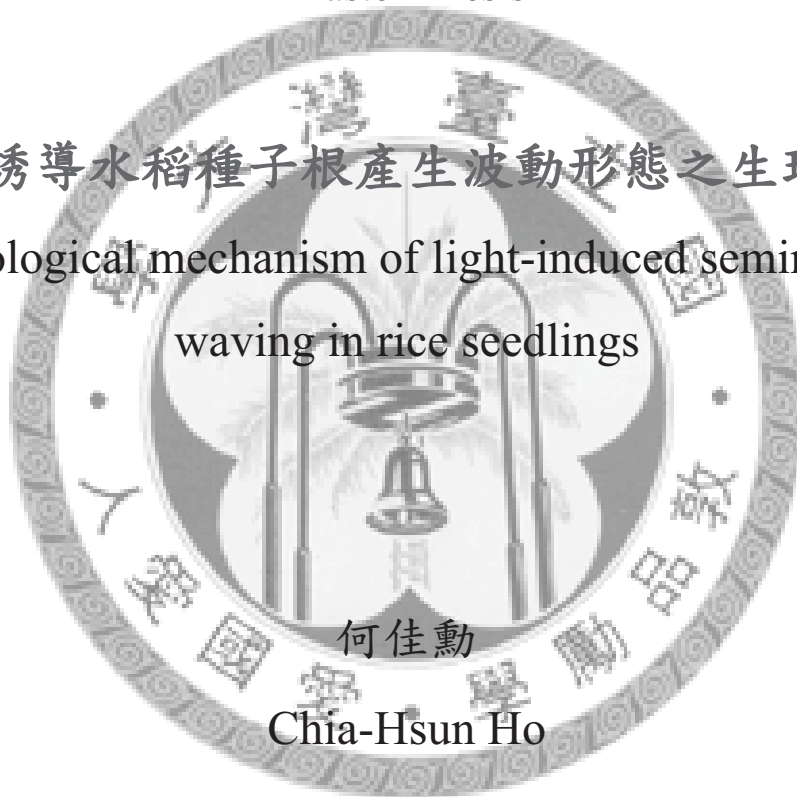
國立臺灣大學生物資源暨農學院農藝學系

碩士論文

Department of Agronomy
College of Bioresources and Agriculture
National Taiwan University

Master Thesis

光照誘導水稻種子根產生波動形態之生理機制
Physiological mechanism of light-induced seminal root
waving in rice seedlings



何佳勳
Chia-Hsun Ho

指導教授：王淑珍 博士

Advisor: Shu-Jen Wang, Ph.D.

中華民國九十九年一月

January, 2010

目錄

目錄.....	I
圖表與附錄目錄.....	III
縮寫對照表.....	IV
中文摘要.....	V
英文摘要.....	VI
前言	
1. 植物根部形態對植物生長發育之影響.....	1
2. 影響植物根系生長發育及形態之因子.....	1
3. 根部感應光訊息之機制.....	6
4. 植物荷爾蒙會參與根部形態變化且為環境訊息之調控因子.....	8
5. 本論文之研究主題.....	13
材料與方法	
1. 植物材料.....	14
2. 光照對水稻根部形態之分析.....	14
3. 其他因子對水稻根部形態之影響.....	15
4. 根部石蠟切片之處理.....	16
5. 荷爾蒙抑制劑之處理.....	18
6. 水稻茉莉酸生合成相關基因之選殖.....	19
7. 基因表現之分析.....	22
結果	
1. 不同水稻品種在光照及黑暗處理下其根部之生長形態.....	25
2. 其他影響水稻根部產生波動形態之因子.....	25
2.1. 於黑暗環境下空氣中相對濕度對水稻根部形態之影響.....	25
2.2. 蔗糖處理對水稻根部形態之影響.....	26

2.3. 光照處理下水稻根尖澱粉體之分析.....	26
3. 感應光源訊息之組織部位.....	26
4. 光照對台中在來 1 號(TCN1)水稻根部細胞大小之影響.....	27
5. 光質及光強度對水稻根部形態之影響.....	27
5.1. 光質對台中在來 1 號(TCN1)根部形態之影響.....	27
5.2. 光強度對台中在來 1 號(TCN1)根部形態之影響.....	28
6. 植物荷爾蒙對水稻根部產生波動形態之影響.....	29
6.1. 茉莉酸生合成抑制劑(Aspirin)之影響.....	29
6.2. 茉莉酸生合成基因參與 TCN1 種子根產生波動形態之調控.....	30
6.2.1. 茉莉酸專一性引子的設計.....	30
6.2.2. 於不同光質處理下茉莉酸之相關基因的表現.....	30
6.3. 生長素極性運移抑制劑(NPA)之影響.....	32
討論	
1. 光照促使水稻種子根產生波動形態且抑制種子根之延長.....	34
2. 影響根部波動形態之因子.....	35
3. 光訊息對 TCN1 水稻根部細胞之影響及其感應機制.....	36
4. 光質及光強度對 TCN1 水稻波動根之影響.....	37
5. 植物荷爾蒙對 TCN1 水稻種子根產生波動形態之影響.....	38
6. 結語與未來展望.....	40
參考文獻.....	41

圖表與附圖目錄

表一、不同白光強度下台中在來 1 號(TCN1)水稻種子根之波動百分比.....	49
圖一、光照誘導台中在來 1 號(TCN1)種子根產生波動形態	50
圖二、高空氣相對濕度誘導水稻種子根產生捲曲形態	51
圖三、蔗糖處理對水稻根部形態之影響	52
圖四、光照及黑暗處理對水稻根尖澱粉體之分析	53
圖五、感應光源之組織部位	54
圖六、利用石蠟切片觀察 TCN1 水稻種子根之波動形態	55
圖七、光質對台中在來 1 號(TCN1)種子根之影響	56
圖八、不同白光強度對台中在來 1 號(TCN1)水稻種子根之影響	57
圖九、利用茉莉酸生合成抑制劑之處理以觀察 TCN1 水稻種子根之波動形態	58
圖十、於紅光及低藍光下處理茉莉酸生合成抑制劑對波動狀跟形成之影響	59
圖十一、利用 RT-PCR 選殖 <i>OsAOS</i> 家族基因之 cDNA 片段	60
圖十二、TCN1 水稻種子根中 <i>OsAOS</i> 家族基因於不同光質處理下之表現	61
圖十三、TCN1 水稻種子根中 <i>OsOPR1</i> 基因於不同光質處理下之表現	62
圖十四、TCN1 水稻種子根中 <i>OsRMC</i> 及 <i>RSOsPR10</i> 基因於不同光質處理下之表現	63
圖十五、生長素極性運移抑制劑對光照誘導 TCN1 水稻種子根波動形態之影響	64
圖十六、光照誘導水稻種子根產生波動形態之調控機制	65
附圖一、不同紅光強度對 TCN1 水稻種子根之影響	66
附圖二、不同藍光強度對 TCN1 水稻種子根之影響	67

縮寫對照表

簡 寫	全 名
AOS	allene oxide cyclase
CRY	cryptochromes
DAI	day after imbibitions
DEPC	diethyl pyrophocarbonate
DMSO	Dimethylsulfoxid
IAA	Indole-3-acetic acid
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiolgalacto-pyranoside
JA	Jasmonic acid
JMT	S-adenosyl-L-methionine: JA carboxyl methyltransferase
LB	Luria-Bertani
LOX	lipxygenase
MeJA	methyl jasmonate
MOPS	3-[N-Morpholino]propanesulfonic acid
NPA	N-1-naphthylphthalamic acid
OPDA	12-oxo-phytodienoic acid
OsAOS	<i>Oryza sativa</i> allene oxide synthase
OsOPR	<i>Oryza sativa</i> 12-oxophytodienoic acid reductase
OsRMC	<i>Oryza sativa</i> root meander curling
PHOT	phototropins
PHY	phytochromes
PKS1	Phytochrome kinase substrate1
RSOsPR10	root specific rice PR10
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
Ubi	Ubiquitin
X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-D-galactopyranoside

摘要

光照是調控植物生長發育的重要環境訊息因子之一，本研究發現於水稻(*Oryza sativa* L.)種子發芽過程中，光照刺激會誘導秈型稻之台中在來 1 號(Taichung Native 1; TCN1)水稻種子根產生波動形態，而粳型稻之台農 67 號(Tainung 67; TNG67)則無此現象發生。幼苗局部照光之實驗結果指出，誘導根波動之光訊息主要是由根部組織直接接收及感應。由根部之切片觀察，發現光照會造成根部的中柱細胞兩側細胞產生不對稱生長，進而導致波動形態之發生。進一步觀察不同光質及光強度對 TCN1 水稻種子根之影響，結果發現不同光強度之紅光及白光處理下均會誘導 TCN1 水稻種子根產生捲曲及波動形態。另一方面，高光度之藍光($90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)不會誘導根波動之現象發生，然而較低光度之藍光($30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)則會誘導種子根波動；故不同藍光的光強度造成根部形態有明顯的差異。利用 Aspirin 抑制水稻內生茉莉酸之生合成，會降低 TCN1 水稻種子根於紅光($90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)、低藍光($30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)及白光($90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)誘導下所產生的捲曲及波動百分比；進一步利用 real-time RT-PCR 分析 TCN1 水稻種子根中茉莉酸生合成及訊息傳導基因之表現，發現 *allene oxide synthase* (*OsAOS*) 家族基因、*12-oxophytodienoic acid reductase 1* (*OsOPR1*) 及 *root specific rice PR10* (*RSOsPR10*) 均會受到紅光及白光處理而誘導其表現。N-1-naphthylphthalamic acid (NPA) 會抑制生長素(Auxin)流出載體蛋白的功能，以破壞水稻之生長素極向運移，結果指出 NPA 會抑制白光誘導 TCN1 水稻種子根產生的波動形態且會影響根部之向地性反應。綜合以上實驗結果，推測茉莉酸生合成及生長素極向運移反應均為光照誘導 TCN1 水稻種子根產生捲曲及波動形態所必須之條件。

Abstract

Light is an important environmental factor controlling plant growth and development. In this study, it was observed that continuous white light can induce the wavy growth pattern of seminal roots in germinating rice (*Oryza sativa* L. cv. Taichung Native 1; TCN1) seeds. However, the phenotype of light-induced wavy root was genetic diverse among rice cultivars; for example, the light-induced wavy root could be presented in seedlings of indica type rice (such as TCN1), but could not be presented in that of japonica type cultivars (such as Tainung 67; TNG67). According to the experiment with plants partially exposed to light, it was suggested that the light signal for inducing the wavy roots were directly sensed by root tissues. Analysis of longitudinal sections of wavy seminal roots indicated that light-induced root waving was caused by the asymmetric cell growth on both side of vascular cylinder cells in the root tips. In addition to white light, red light ($90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) could also induce root curling phenotype on seminal roots. However; the blue light with high intensity ($90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) presented no effect on inducing root waving/curling. On the other hand, other results in our laboratory showed that low intensity ($30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) of blue light could induce root waving. Using Aspirin to inhibit endogenous jasmonic acid (JA) biosynthesis in TCN1 seedlings conducted the light-induced curling/wavy root phenotypes were absent. Furthermore, light effects on expressions of the genes involved in JA biosynthesis, i.e., *allene oxide synthase* (*OsAOS*) gene family and *12-oxophytodienoic acid reductase* (*OsOPR1*), and a root specific JA-responsive gene, *root specific rice PR10* (*RSOsPR10*) were observed. The data showed that transcript levels of most JA biosynthesis-related and JA-responsive genes were increased in white- and red-light conditions. Moreover, N-1-naphthylphthalamic acid (NPA), an inhibitor of auxin efflux carriers, was used to interrupt auxin polar transport in roots,

and then the morphology of light-induced wavy root was eliminated. Thus, the results suggested that JA biosynthesis and auxin polar transport were essential for light-induced seminal root waving in seedlings of indica type rice.



前言

1. 植物根部形態對植物生長發育之影響

作物根部形態及根系結構在作物生長發育過程中扮演相當重要的角色，其具有二種主要的功能分別為吸收土壤中的養分及水分以提供植物生長時的需求，且具有支持及固定植物的作用(Nye et al., 1979)。已知水稻種子經水分浸潤後會促使水稻種子發芽，而最初冒出內、外穎之初生根稱為種子根(seminal root)，為負責幼苗早期之水分及養份的吸收，故種子根的生長速率及形態對水稻幼苗之生長相當重要。Uga 等人(2009)之研究證實籼型稻及粳型稻之遺傳背景差異會造成其根系形態的不同，如粳型稻的根部較粗且具有較寬的導管，使其 root/shoot 比率較高，而籼型稻的根較細且導管較窄，其 root/shoot 比率則較低(Lafitte et al., 2001)，故可知植物根部形態會影響水分及養分之吸收，進而改變植物的生長發育。

2. 影響植物根系生長發育及形態之因子

植物根系會受到不同環境訊息之影響，且會根據不同環境情況而改變其發育形態及功能特性以利植物的生長。目前研究顯示植物根系結構主要是藉由內生的遺傳基因及外界的環境因子所決定，已知光照、重力、濕度、溫度、養分及阻礙物之刺激等都會影響植物根系的生長發育及形態(Feldman, 1984; Osmont et al., 2007; Rebouillat et al., 2009)。研究指出乾旱逆境是造成水稻產量下降的主要因子(Nguyen et al., 1997)，而水稻為了適應乾旱逆境則會發展出較深的根系以吸收深層土壤水分(Clark et al., 2002)。另一方面，緊密的土壤會限制作物根系穿透進入土壤中，導致作物無法有效吸收土壤水分及養分，進而使作物產量下降(Clark et al., 2003)；已知丘陵地的粳型稻栽培品種根部具有較高的土壤穿透能力，因此可以有效改善水稻對乾旱逆境的耐性(Nhan et al., 2006)。故環境因子會影響植物根部的粗細、延長的深度及根長的密度等形態特性，而使植物適應當時的環境，以維持植

物的生長發育及產量。

2.1. 重力及阻礙物刺激對根系形態之影響

重力會影響植物根系的向地性反應，主要是根冠的中軸細胞會因密度大的澱粉體(amyloplasts)累積沉降，而感應重力之影響(Sack, 1997)；且澱粉體沉降可能會活化未知的接受物質(receptor)進而驅動訊息傳導途徑，導致植物生長調節物質(例如:auxin、Ca²⁺)重新分配至根尖細胞而促使根部的向地性彎曲(Sedbrook et al., 1998; Rosen et al., 1999)。當植物根部欲穿透土壤孔隙時，如土壤中的機械阻礙會使根系生長受到限制，Wilson 等人(1977)之研究指出大麥根系若生長在緊密土壤中，則其根系的生長速率會減緩並且會增加根的直徑厚度。另一方面，根冠之存在有助於植物根系之生長，Iijima 等人(2003)利用移除玉米根冠實驗，證實當根部欲穿透土壤時，根冠具有緩和土壤機械阻礙的功能，進而促使玉米根部能在緊密土壤中快速生長。

當阿拉伯芥幼苗生長於較高硬度之洋菜固體培養基(1.5% agar)時，培養基放置的傾斜程度會影響阿拉伯芥根部的發展形態，如以 90° 垂直放置，則幼苗初生根(primary root)會筆直地生長，但培養基以 45° 放置時，因洋菜膠體表面會阻礙初生根垂直生長，因而促使根部產生波動之形態(Okada and Shimura, 1990; Simmons et al., 1995)。進一步利用阿拉伯芥突變體探討根部波動形態之調控機制，Santner 及 Watson(2006)之研究發現，*wag1* 及 *wag2* 之突變體會提高阿拉伯芥根部在阻礙物刺激下所產生的波動形態，故可知 WAG1 及 WAG2 會負向調控根部的波動形態發生，且 WAG1 及 WAG2 會參與生長素轉運之調控。Pandey 等人(2008)之研究發現 *xlg3* 和 *agb1* 為阿拉伯芥 extra large G protein 之突變體，其會減緩阿拉伯芥根部在阻礙物刺激下的波動形態，由此可知 XLG3 和 AGB1 會正向調控根部的波動形態，且 XLG3 及 AGB1 會調控乙烯及生長素轉運等植物荷爾蒙，進而影響根部波動形態之反應。另一方面，研究顯示阿拉伯芥根部在阻礙物刺激下，會降低根部

對重力的敏感程度且抑制根冠之中軸細胞的澱粉體沉降，進而影響根部的生長形態(Massa and Gilroy, 2003)。

2.2. 溫度及濕度對根系形態之影響

溫度會影響根的延長、根毛的發育及生理活性等，Poerwanto 等人(1989)研究溫度對蜜柑(satsuma mandarin, *Citrus unshiu* Marc. Cv. Okitsu Wase)根部形態及生理之相關性，結果指出於 15°C 環境下會明顯限制根的生長，而 30°C 環境下則根部生長強健且具有最長之根長及根重，另外在提高溫度環境下會使根毛長度增加。

另一方面關於濕度對根部形態相關研究指出，浸潤 4 天之 IR8 (*Oryza sativa* L. ssp. indica)水稻幼苗培養在持續白光($100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)及空氣飽和相對濕度(100%)的環境下，會促進地上部藉由韌皮部將生長素轉運至根部之速度，進而增加水稻幼苗側根的形成且誘導水稻根部產生捲曲形態(Chhun et al., 2007)。

2.3. 養分對植物根系之影響

除了環境因子會影響根系結構之外，土壤中之養分含量亦會改變根系構造，如阿拉伯芥生長在高氮濃度環境之下，初生根(primary root)及側根(lateral root)之延長會被抑制，反之若生長在缺氮環境下，則會誘導側根之延長(Linkohr et al., 2002)。已知根毛可以幫助植物吸收土壤中的養分及水分，植物若生長在缺磷環境下則會使植株生長矮小且出現缺磷之病徵，而有些植物在缺磷環境下會增加根毛的延長(Foehse and Jungk, 1983)。Bates 及 Lynch (2000)探討磷對抑制根毛密度(*rhd6*)及延長(*rhd2*)之阿拉伯芥突變體之相關研究，實驗結果指出根毛突變體地上部之生物量及對磷含量之吸收均比野生型阿拉伯芥低，因此可以得知在低磷含量下會增加根毛的生長，以提高野生型阿拉伯芥對磷之吸收。

2.4. 植物光源接受器及光對根系形態之影響

2.4.1. 植物光源接受器

光照為重要的環境訊息因子以調控植物的生長發育過程，如光照會影響光合作用以提供植物生長的能量來源，而且還會影響種子萌芽及開花現象等生理反應 (Sullivan and Deng, 2003; Franklin et al., 2005)。文獻研究指出光質、光強度及光週期均會影響植物的生長發育，如藍光的光強度在波菜方面之研究指出，波菜生長在 $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的藍光光強度下，其會增加葉片之光合作用效率且提高每單位葉面積的葉片氮含量 (Matsuda et al., 2007)

光質對植物生長發育之調控主要是藉由植物光源接受器 (photoreceptor) 對不同光波長進行感應，目前已知的植物光源接受器主要可分成四大類，分別為感應紅光及遠紅光訊息之 phytochromes (PHY)、感應藍光訊息之 cryptochromes (CRY) 和 phototropins (PHOT)，以及吸收紫外光 B (UVB) 的未知光源接受器等 (Jiao et al., 2007)。植物光源接受器以 phytochromes 之研究最為清楚，其主要是由多基因家族 (multiple gene family) 所組成，在阿拉伯芥中具有五個家族基因分別為 *PHYA-PHYE* (Sharrock and Quail, 1989)，而水稻中則有三個家族基因為 *PHYA-PHYC*，其中 *PHYA* 及 *PHYB* 在紅光下有助於水稻幼苗之光形態發生，而 *PHYA* 及 *PHYC* 則會同時參與遠紅光之反應 (Mathews and Sharrock, 1996; Takano et al., 2005)。已知阿拉伯芥及水稻中具有兩個 cryptochromes 基因分別為 *CRY1* 及 *CRY2* (Casal, 2000; Matsumoto et al., 2003)，而阿拉伯芥及水稻中亦具有兩個 phototropins 基因為 *PHOT1* 及 *PHOT2* (Briggs and Christie, 2002; Jain et al., 2007)。

植物的光形態發生 (Photomorphogenesis) 主要是藉由植物組織感應光源訊息，進而影響植物體中之訊息傳遞過程，導致最終的光形態反應 (Correll and Kiss, 2002)，如在阿拉伯芥相關研究指出 phytochromes 及 cryptochromes 會共同參與去白化作用 (de-etiolation) 之調控，而 phototropins 則會影響向光性、葉綠素移動及氣孔開啟等 (Briggs and Christie, 2002; Sullivan and Deng, 2003)；在水稻方面研究顯示

phytochromes 為主要參與光抑制水稻鞘葉(coleoptile)生長之反應(Pjon and Furuya, 1967; Xie et al., 2007)。

2.4.2. 光對植物根系之影響

植物除了地上部組織會感應光源訊息並影響其生長之外，亦發現光照會調控植物根部的發育及生長形態，如光會影響根部的向地性反應、根毛的形成、初生根之延長及根部的向光性反應等(Ohno and Fujiwara, 1967; Oyama et al., 1997; Ruppel et al., 2001; Molas et al., 2006)。目前光照對阿拉伯芥根部形態相關研究顯示，若阿拉伯芥根部被單向紅光照射時，其根部會朝向光源方向生長，此現象稱為正向光性(positive root phototropism)，而進一步利用 phytochromes 突變體之研究證實，紅光所引起之正向光性反應主要是藉由 PHYA 及 PHYB 所調控；於單向藍光處理下則阿拉伯芥的根部會偏離光源方向生長，而此現象則稱為負向光性(negative root phototropism)，利用 phytochromes 及 phototropins 之阿拉伯芥突變體，證實 PHOT1 及 PHYA 會參與藍光誘導阿拉伯芥根部產生負向光性之調控路徑(Ruppel et al., 2001; Kiss et al., 2003; Boccalandro et al., 2008)。

在水稻方面研究指出，白光會抑制水稻幼苗種子根(seminal root)之延長，且不同光質所造成之效應有所不同，如紅光及遠紅光會抑制細胞之延長(cell elongation)，而藍光會同時抑制細胞之延長及細胞之增加(cell multiplication) (Ohno and Fujiwara, 1967)，於 Shimizu 等人(2009)之研究進一步指出 PHYA 及 PHYB 為主要調控光抑制水稻根部生長之因子，且水稻根部為感應光訊息之組織部位；在其他物種如玉米及豌豆中，亦可發現光抑制根部延長之現象發生(Torrey, 1952; Wilkins and Wain, 1974)。Wang 等人(2002)之研究亦發現光照會誘導水稻根部產生負向光性反應，而植物荷爾蒙之生長素可能會參與此反應的訊息調控。

2.4.3. 光與重力之交互作用

光及重力為環境之重要訊息因子，其彼此會互相作用以影響植物之生長發育。研究指出阿拉伯芥中具有共同的訊息傳遞因子，以調控植物對光的向光性及對重力的向地性反應，而重力及光照訊息之交互作用非常複雜，其可能會扮演協同作用或拮抗作用以影響植物最終形態的改變(Hangarter, 1997; Correll and Kiss, 2002)，如破壞阿拉伯芥根部感應重力之 *pgm* 突變體給予持續之單向紅光照射時，*pgm* 突變體之根部與野生型阿拉伯芥相比則會提高紅光誘導之正向光性反應(Kiss et al., 2003)；在玉米方面研究指出，若將玉米培養在黑暗環境下其根部會水平地生長，而給予光照時則會促使根部向地生長(Feldman and Briggs, 1987)。另一方面，於 Boccalandro 等人(2008)之研究顯示 Phytochrome kinase substrate1 (PKS1)在單向藍光照射下，其會正向調控阿拉伯芥根部之負向光性反應，且負向調控根部之向地性反應。

2.4.4. 光與養分之交互作用

於 Shimizu 等人(2009)之研究指出水稻(*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare)在生長過程中添加氮素時，會抑制水稻種子根之生長，若將其培養在光照處理下則會促使水稻種子根產生盤繞(coiled)之形態發生，但在無添加氮素之光照環境下，水稻種子根則不具有盤繞形態發生。另一方面，於光照環境下會抑制水稻種子根之生長，但冠根(crown roots)在光照下則會被促進生長，然而氮素之添加則會同時抑制水稻種子根及冠根之生長，因此光與養分會互相作用以影響水稻根部形態之變化。

3. 根部感應光訊息之機制

土壤質地特性及植物葉片冠頂(leaf canopies)之密度，可能會影響光線穿透土壤表面之強度，其中土壤是由砂土、坩土及粘土所組成，隨著土壤深度的改變則

土壤特性也會有所差異。Mandoli 等人(1990)之研究顯示光線在砂土中具有較佳的穿透力，且土壤質地特性、土壤深度及土壤水分含量等都會影響土壤中的光譜特性，進而影響植物的種子發芽及根部的光形態發生。

3.1. 根部細胞中的光源接受器為感應光訊息之因子

已知土壤質地特性會影響光線穿透土壤表面之強度，故可能會促使靠近土壤表面之上層根部細胞感應光源訊息，此光源訊息會進一步暗示植物根部於土壤表面之位置，進而改變植物根系結構以利植物根系之生長。於 Galen 等人(2007)之研究將阿拉伯芥的 *PHOT1* 基因接上 green fluorescent protein (GFP) 之轉植株以觀察 *PHOT1-GFP* 之表現位置，其結果指出 phototropin-1 存在於阿拉伯芥之初生根及側根細胞且具有調節靠近土壤表面之根部生長效率以提高阿拉伯芥根部之耐旱性；此外，Salisbury 等人(2007)將阿拉伯芥的 phytochromes 啟動子接上 GFP 或 luciferase 之研究也顯示阿拉伯芥之初生根及側根的根尖細胞可以偵測到 phytochromes 的表現。另一方面，於 Shimizu 等人在 2009 年利用蛋白質分析實驗證實水稻根部細胞中具有 phytochromes 蛋白質之存在，且限制照光區域之實驗指出根部中的 phytochromes 為主要調控水稻種子根之光抑制反應。

3.2. 維管束組織具有傳遞光源訊息之功能

Sun 等人於 2003 及 2005 年之相關研究指出，植物的莖部及根部之維管束組織會參與光訊息之傳導，而植物幼苗之葉片組織可以感應光源訊息，其可藉由維管束組織的光源傳導系統而使植物根部感應光訊息，進而引起根系之光形態發生；且進一步分析植物內部光源傳導之光譜特性，其結果指出遠紅光(far-red light)能有效地在維管束組織中進行傳導，而 phytochromes 能感應遠紅光訊息，因此推測 phytochromes 可能會調控植物內部光源傳導特性之代謝活性。

3.3. 根冠為感應光訊息之組織部位

已知大部份的植物主要是藉由根冠(Root cap)來感應環境訊息之暗示進而改變根部的生長形態。在根部細胞中，根冠是由在中心位置的中軸細胞(central columella cell)及外層的側根冠細胞(lateral root-cap cell)所組成，其可持續地被根尖分生組織之起始分裂細胞所取代(Dolan, 1993)，其中根冠會包覆根尖分生組織(root apical meristem)以保護生長點避免土壤機械傷害，而根冠亦能分泌化合物以幫助根系在土壤中之生長，且能與有益的微生物作用形成生物性根圈(biological rhizosphere)(Hawes et al., 2003)。目前研究顯示光照會抑制玉米初生根的延長，而 Wilkins 及 Wain (1974)利用移除玉米根冠之研究證實根冠能感應光照訊息進而抑制玉米初生根之延長。另一方面，在水稻及玉米方面研究指出若移除根冠組織，則光照誘導根部產生的負向光性反應則會消失，由此可知根冠為感應光訊息之組織部位(Mullen et al., 2002; Wang et al., 2002)。

4. 植物荷爾蒙會參與根系形態變化且為環境訊息之調控因子

已知植物荷爾蒙會影響植物根系形態變化，如茉莉酸(jasmonic acid, JA)會抑制水稻種子根之延長且於低濃度下可以誘導側根之形成(Moons et al., 1997; Wang et al., 2002)；此外，生長素也會抑制水稻種子根之延長且影響側根之形成(Wang et al., 2003)。而生長素的含量變化也會影響植物根部細胞之延長，Mo 等人(2004)之研究指出於水稻根尖外加 IAA 處理後，會促使水稻根尖朝向 IAA 處理之部位彎曲，並且經 IAA 處理的根部表皮細胞大小比無 IAA 處理之細胞較小。於阿拉伯芥之研究指出在重力及接觸阻礙物刺激影響的條件下，植物荷爾蒙例如生長素(auxin)及乙烯(ethylene)會參與根部波動形態之發生。利用阿拉伯芥突變體之研究指出 *WAG1* 及 *WAG2* 會負向調控植物根部之波動形態，而阿拉伯芥之 *WAG1* 及 *WAG2* 基因轉譯的蛋白質 serine/threonine kinase 與 *PINOID* 基因具有很高的相似性，而 *PINOID* 會參與在 auxin 轉運或訊息傳遞過程，因此利用 auxin 轉運抑制劑

N-1-naphthylphthalamic acid (NPA)觀察是否會影響 *wag1/wag2* 突變體根部之波動形態，結果指出 NPA 會減緩野生型阿拉伯芥根部波動形態，但不會影響 *wag1/wag2* 突變體根部之波動形態，故 WAG1 及 WAG2 會參與生長素轉運之調控(Santner and Watson, 2006)。另一方面，由 Buer 等人(2003)發現增加乙烯含量會抑制阿拉伯芥根部之延長且促使根部波動頻率增加，然而在含有 Okada and Shimura salt(OS salt)且無蔗糖處理之培養基則會使根部生長速率變快，進而降低根部波動之頻率。此外，蔗糖也會影響根部波動之頻率，如在沒有營養成分之培養基中，蔗糖會降低根部之波動頻率，而在含有 OS salt 之培養基中，蔗糖處理則會提高根部之波動頻率。由此可知生長素轉運、乙烯會正向調控阿拉伯芥根部之波動形態，而且根的延長速率快時則會降低根的波動頻率。

在水稻部分之相關研究，Jiang 等人(2007)利用 RNAi 技術抑制水稻根部之 *OsRMC* (*Oryza sativa* root meander curling gene)基因，其會使轉殖株水稻之初生根變短、不定根(adventitious roots)的數目增加且側根的數目減少等，此外還會促使根部產生捲曲(curling)形態發生。另一方面，抑制 *OsRMC* 之轉殖株水稻種子根在光照環境下，若無接觸培養基底部時其根部會產生波動形態，而在接觸培養基底部時則會產生捲曲之形態；甚至外加茉莉酸(jasmonic acid, JA)處理時會誘導野生型水稻幼苗中 *OsRMC* 之表現，因此推測茉莉酸可能會參與水稻根部捲曲之形態發生而 *OsRMC* 在此過程中則扮演負向調控因子(negative regulator)。

而本研究主要著重於光照對植物根系形態之影響是否會藉由植物荷爾蒙作為訊息傳遞因子，且由文獻研究已知光照會影響植物中茉莉酸及生長素的含量變化，故後續將特別介紹茉莉酸和生長素對植物根系及受光調控之機制。

4.1. 茉莉酸之生合成途徑及受光調控之機制

茉莉酸(jasmonic acid, JA)、茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)及其相關化合物均稱為 jasmonates，已知茉莉酸為植物生長調節物質(plant growth regulator)，其

會參與植物生長發育過程如種子萌芽、葉片老化及果實成熟等，且亦會參與植物生物性或非生物性逆境之反應，如創傷及病原菌感染(Creelman and Mullet, 1997)。茉莉酸為 octadecanoid 途徑之最終產物，其過程是 lipase 首先將細胞膜上的磷脂(phospholipids)分解成亞麻油酸(linolenic acid)，其經過 lipoxygenase (LOX)作用轉變成 13-hydroperoxylinolenic acid (13(S)-HPOT)，亦會被 allene oxide synthase (AOS) 及 allene oxide cyclase (AOC)作用形成 12-oxo-phytodienoic acid (OPDA)，而 OPDA 經由 12-oxo-phytodienoic acid reductase (OPR)的還原反應，再經過三次的 β -oxidation 形成最終產物 jasmonic acid (JA)，而 JA 藉由 S-adenosyl-L-methionine: JA carboxyl methyltransferase (JMT) 甲基化作用後形成 MeJA，其在植物防禦系統中亦作為訊息因子(Creelman and Mullet, 1997; Mueller, 1997; Schaller, 2001; Turner et al., 2002)。

已知 allene oxide synthase (AOS)為茉莉酸生合成途徑之關鍵酵素，且創傷反應會促使水稻之 AOS 基因大量表現；此外，研究發現光照可能具有調控水稻 AOS 基因之表現(Agrawal et al., 2002)。由 Haga 及 Iino(2004)發現水稻中至少具有 4 個 *OsAOS* 基因，分別命名為 *OsAOS1*, 2, 3 及 4，研究指出紅光及遠紅光會誘導水稻幼苗之葉片組織中 *OsAOS1* 及 *OsAOS4* 基因的表現，進一步利用水稻 *phyA* 突變體之研究發現，光誘導 *OsAOS* 之表現主要是藉由光敏素進行調控；另一方面，也發現茉莉酸之生合成基因 *OsOPR1* 亦會受到紅光訊息之調控而表現(Riemann et al., 2003)，目前利用序列比對方式發現水稻中至少具有 10 個 *OsOPR* 基因，分別命名為 *OsOPR1-10* (Tani et al., 2008)。由 Peña-Cortés 等人在 1993 年之研究指出 Aspirin 可以抑制蕃茄中因創傷而增加的內生茉莉酸含量；且 Pan 等人(1998)之研究進一步證實 Aspirin 會與 AOS 酵素共同競爭受質，且 Aspirin 能夠將 AOS 酵素乙酰化進而抑制 AOS 之酵素活性。

由文獻研究結果指出光照會抑制水稻鞘葉(coleoptiles)之伸長，而茉莉酸(JA)也會調控植物鞘葉伸長之過程中且其扮演重要之負向調控因子，例如在燕麥(oat)

及玉米之研究中指出茉莉酸會抑制生長素(IAA)所誘導鞘葉之伸長(Ueda et al., 1994; Irving et al., 1999)。

4.2. 生長素運移系統及其對植物根系之影響

Indole-3-acetic acid (IAA)為植物中之主要內生的生長素(auxin)，其在植物之生長發育過程中扮演重要的角色，如細胞分裂、分化及延長，且還會影響維管束之發育及植物之向性(tropism)等(Teale et al., 2006)。已知 IAA 有兩個主要的合成途徑，分別為 Trp-dependent 及 Trp-independent 途徑(Zazimalova and Napier, 2003)，其主要是在莖頂組織所合成，藉由韌皮部及極向運移系統(polar transport system)將生長素轉運至根部，而近期之研究證實生長素亦能在阿拉伯芥之根尖所合成(Reed et al., 1998; Liung et al., 2005; Michniewicz et al., 2007)。生長素在細胞與細胞間的極性運移主要是藉由生長素流入載體蛋白(auxin influx carrier proteins)(如 *AUX1* 及 *LAX (AUX1-like)* 基因家族)及生長素流出載體蛋白(auxin efflux carrier proteins)(如 *PIN-FORMED (PIN)* 家族)所完成(Bennett et al., 1996; Gälweiler et al., 1998; Michniewicz et al., 2007; Laxmi et al., 2008)。

已知生長素的極向運移模式是根據化學滲透假說(chemiosmotic hypothesis)，其藉由酸性細胞壁(pH 5.5)和細胞質(pH 7.0)之間的 pH 值差異而促使 IAA 進入細胞內，因細胞壁之酸性環境會使 IAA 以質子化的形式存在(IAAH)，其以簡單擴散方式穿透細胞膜而進入細胞內，而細胞質之鹼性環境則會使 IAA 去質子化以極性陰離子方式存在(IAA⁻)，此 IAA⁻ 無法穿透細胞膜而導致 IAA 累積在細胞內，而其可藉由生長素流出載體(auxin efflux carrier)離開細胞體；此外，研究發現生長素流入載體(auxin influx carrier)之存在，其可以幫助部分 IAA⁻ 進入細胞體內，而流入及流出載體蛋白在細胞膜上的不對稱分佈會改變生長素的極向運移方向(Rubery and Sheldrake, 1974; Raven, 1975; Goldsmith, 1977; Michniewicz et al., 2007)。

生長素的極向運移在植物之生長發育過程中相當重要，於 Zhou 等人(2003)使

用 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA)及 9-hydroxyfluorene-9-carboxylic acid (HFCA)為生長素極向運移之抑制劑，其結果顯示生長素極向運移系統會抑制水稻初生根之延長、側根之生長和延長以及不定根之形成等。而 N-1-naphthylphalamic acid (NPA) 為生長素流出載體蛋白之抑制劑(Goldsmith, 1977)，於 Xu 等人(2005)之研究指出 NPA 可以抑制水稻側根及不定根(adventitious roots)之生長，而利用 RNA 干擾技術降低水稻 *OsPIN1* 基因表現之轉植株，其不定根之突出及發育形態與 NPA 處理結果相似；且在阿拉伯芥之研究亦顯示 NPA 可以破壞植物向地性及向光性反應且亦能抑制根部及幼苗之延長(Garbers et al., 1996)。

由先前文獻研究顯示植物的向地性反應與生長素在根尖之不對稱分配有關，已知根冠為生長素重新分配之組織部位，而重力會影響生長素的側向分配之流量且生長素之濃度差異會影響根部表皮細胞之不對稱生長，進而引起植物根部之向地性彎曲(Young et al., 1990; Dolan, 1998; Sedbrook et al., 1998)；於阿拉伯芥之研究指出 PIN3 位於根冠的中軸細胞之細胞膜上，而中軸細胞含有感應重力之平衡石存在，因此平衡石之沉降可能會促進 PIN3 極性的改變，進而調控生長素的不對稱分配(Friml et al., 2002; Michniewicz et al., 2007)。除了重力會影響生長素的側向分配之外，已知光照也會調控細胞內之生長素含量及分配等，如光照會調節生長素流出載體蛋白(PIN2)在細胞膜上的分佈，於光照下會促使 PIN2 聚集在細胞膜上，而在黑暗環境下 PIN2 則會被降解並轉移至液胞中(Laxmi et al., 2008)；於 Blakeslee 等人(2004)之研究發現，在單向藍光照射下會改變阿拉伯芥胚軸(hypocotyls)之 PIN1 蛋白質的分佈位置，進而改變生長素之分配含量，導致胚軸產生向光性彎曲。另一方面，已知生長素氧化酶(IAA oxidase)是調控生長素代謝過程之因子，Hillman 及 Galston (1956)之研究指出紅光會抑制豌豆植物中生長素氧化酶的活性，進而影響植物中生長素的含量。

5. 本論文之研究主題

早期對於植物根部形態之研究主要著重在重力對植物根部之影響，而近期之研究開始逐漸在探討光對植物根部形態之影響。文獻研究指出植物根部能夠感應光源訊息進而改變根部形態，且光源接受器會表現在植物的初生根及側根。另外在光照環境下會抑制植物根部之延長且光質會影響根部形態之改變，而植物荷爾蒙可能會參與光訊息之調控進而影響植物根系形態。另一方面，已知阻礙物刺激及外加 JA 處理時會誘導植物根部產生波動及捲曲形態，然而先前研究並未說明光照對水稻根部產生波動形態之調控，故我們想要進一步探討水稻種子於發芽期間，光照誘導 TCN1 水稻種子根產生波動形態之機制。因此，本論文之研究主題包含(1)除了光照因子之外是否有其他訊息因子參與水稻根部波動形態之調控；(2)光訊息對 TCN1 水稻根部細胞之影響及根部感應光照訊息之機制；(3)在不同光質及光強度處理下是否會影響此波動形態的改變；(4)利用植物荷爾蒙抑制劑之處理以了解植物荷爾蒙是否會參與此訊息之調控；(5)了解為何在光照處理下會造成不同水稻品種如台中在來 1 號(TCN1)及台農 67 號(TNG67)水稻根部形態之差異。

材料與方法

1. 植物材料

由行政院農委會花蓮區農業改良場提供的 96 年第二期作之台農 67 號水稻種子(*Oryza sativa* L. cv. Tainung 67; TNG67)及行政院農委會台中區農業改良場所提供的 93 年第一期作之台中在來 1 號水稻種子(*Oryza sativa* L. cv. Taichung Native 1; TCN1)作為實驗材料。

2. 光照對水稻根部形態之分析

2.1. 植物材料處理

- (1) 將台中在來 1 號及台農 67 號水稻種子以 1% (v/v) NaOCl 消毒 30 分鐘，並以清水沖洗 4-5 次，放置於濕潤擦手紙之玻璃培養皿中。
- (2) 於 30°C 植物生長箱中黑暗培養 2 天。
- (3) 第三天時選取胚根突出種皮至 0.1-0.3 公分且取 30 顆水稻種子置於 500 mL 玻璃燒杯之鐵網架上，放置於 28°C 之植物組織培養室中進行實驗處理。
- (4) 分別在水稻種子浸潤 3-5 天時，進行水稻幼苗根部形態之觀察。

2.2. 光照處理

將黑暗催芽 2 天之 TCN1 及 TNG67 水稻種子，培養於自然光照室(25/20°C)及組織培養室(28°C, 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)進行全光照處理，另外處理一組全黑暗作為實驗對照，並於水稻種子浸潤 4 天時，以照相方式記錄其根部形態之變化。

2.3. 根部遮光之處理

將黑暗催芽 2 天之 TCN1 及 TNG67 水稻種子，置於 500 mL 避光玻璃燒杯之黑色珍珠板上，以進行水稻根部遮光實驗處理，於水稻種子浸潤 3-5 天時，以照相方式記錄其根部形態之觀察。

2.4. 水稻種子根中澱粉分佈之觀測

將 TCN1 水稻種子於黑暗環境下催芽 2 天，再分別進行白光及黑暗處理 2 天(4 DAI)，利用 I_2/KI (0.05% KI, 0.005% I_2 , 0.01N HCl)進行染色 1-2 分鐘後，以解剖顯微鏡觀察水稻種子根中澱粉分佈情形。

2.5. 不同光質之處理

將黑暗催芽 2 天之 TCN1 水稻種子分別處理紅光($90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)、藍光($90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)、白光($90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)之不同光質處理，另外處理一組全黑暗作為實驗對照。於光照處理 1-3 天(3-5 DAI)時，進行水稻幼苗根部形態之觀察，並收取地上部之幼苗及地下部之種子根材料以萃取總 RNA 進行基因表現分析。

2.6. 不同光照強度之處理

將黑暗催芽 2 天之 TCN1 水稻種子分別於紅光(140、90、60 及 $30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)、藍光(90、60、30 及 $15 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)及白光(180、140、100、50 及 $30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)之光照強度下進行培養，於光照處理 1-3 天(3-5 DAI)時，分別計算不同光強度下其 TCN1 水稻之波動百分比，並以照相方式記錄其根部形態之觀察，並收取不同藍光強度之地上部幼苗及地下部種子根材料以萃取總 RNA 進行基因表現分析。

3. 其他因子對水稻根部形態之影響

3.1. 濕度之處理

將黑暗催芽 2 天之 TCN1 及 TNG67 水稻種子，放置在密閉空間的箱子中且用黑布覆蓋以提高內部空氣相對濕度達到 90-95%，另一組則放置在有孔洞的箱子中以穩定內部空氣相對濕度(40-50%)作為對照組。於黑暗處理 2 天(4 DAI)時進行照相觀察。

3.2. 蔗糖之處理

將黑暗催芽 2 天之 TCN1 及 TNG67 水稻種子，分別放置在含有 0% 及 3% 蔗糖濃度之水溶液中，且置於白光($100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) 下 2 天(4 DAI)，並進行照相觀察。

4. 根部石蠟切片之處理

4.1. 材料固定

主要目的為保持組織完整形態及內容物。

- (1) 將浸潤 4 天且分別處理全光照及全黑暗之 TCN1 及 TNG67 水稻種子根，截取根尖以上 0.5 公分之材料並處理材料 20 倍體積之固定液(5 % 福馬林, 5 % 冰醋酸, 90 % 之 50 % 酒精)。
- (2) 將含有固定液之材料置於抽氣缸內抽氣 1 小時，使組織內氣泡釋出，靜置固定 24 小時，每隔一段時間加以搖晃材料，以幫助局部水分累積之濃度散開。
- (3) 固定完成後以 50 % 酒精清洗，以進行脫水步驟。

4.2. 脫水

去除組織內水分，且水與蠟不互溶，必須以有機溶劑取代水，增加滲蠟效果。經過 5 次脫水流程漸漸地將水抽離，以避免空氣的水蒸氣。

- (1) 以 10 % 丁醇(butanol)、40 % 酒精及 50 % 蒸餾水配置成溶液後，將材料放置於此溶液 2 小時，每隔 30 分鐘搖晃材料，使水分累積濃度能散開。
- (2) 將材料置換於 20 % 丁醇(butanol)、50 % 酒精及 30 % 蒸餾水之溶液中 2 小時。
- (3) 將材料置換於 35 % 丁醇(butanol)、50 % 酒精及 15 % 蒸餾水之溶液中 2 小時。
- (4) 將材料置換於 55 % 丁醇(butanol)、45 % 酒精之溶液中 2 小時。
- (5) 接著將材料置換於 75 % 丁醇(butanol)、25 % 酒精之溶液中 2 小時。
- (6) 最後將材料完全置換在丁醇(butanol)溶液中到隔夜，並進行滲蠟。

4.3. 滲蠟

以蠟取代組織內丁醇，使蠟與材料的軟硬度較接近，以避免切片時造成彎帶及過分皺縮等情況，且滲蠟須要經過 4 天時間處理。

- (1) 取滲蠟專用的固定瓶，瓶內填充約半瓶的純蠟，加入蠟體積 1/3 的丁醇，將材料連同標籤一併放入瓶內，不加蓋。
- (2) 置於 60°C 烘箱中 2 天，讓丁醇慢慢揮發，接著將純蠟加入含有材料之固定瓶中約 4/5 瓶，再置回 60°C 烘箱中 2 天。

4.4. 埋蠟

將材料固定於蠟塊中，以方便切片。

- (1) 將方模上的蠟及污垢清理乾淨，塗上薄薄一層甘油(glycerol)，取出烘箱內的蠟瓶，把材料與蠟倒入方模內。
- (2) 以燒熱鑷子將材料排列整齊，並調整材料高度。
- (3) 待模內的蠟凝固後，小心放入水中架在鑷子上，使蠟塊冷卻均勻，待凝固後取出蠟塊，再進行切片，將埋在蠟中的材料切成連續薄片。

4.5. 載玻片的處理

去除載玻片上的灰塵及污垢後，覆上黏附劑。將新的載玻片浸泡在 95 % 酒精中，並排列於不銹鋼玻片架籃上，待酒精揮發後浸入黏附劑(0.5 g gelatin, 0.05 g Chromium potassium sulfate, 99.45 mL 蒸餾水)，10 分鐘後取出並自然乾燥。

4.6. 張貼蠟帶及展蠟

- (1) 將連續切片的蠟帶置於載玻片上，使其漂浮於蒸餾水面。
- (2) 將載玻片置於 56°C 加熱箱數分鐘，使蠟帶展開。
- (3) 展蠟完畢後，移除多餘的蒸餾水，調整蠟帶至載玻片中央，待其餘水分慢慢地

完全蒸乾，即可收藏在切片保存盒，並進行照像觀察。

4.7. 脫蠟與封片

脫蠟為去除組織上的蠟，以便於光學顯微鏡之觀察；封片則是將玻片脫水做成永久玻片，便於保存。

- (1) 將切片展蠟後的玻片置於玻片架籃上，並放入含有 120 mL xylene 之玻璃缸內 10 分鐘。
- (2) 將玻片架由前一缸溶液換到第二缸之 120 mL xylene 溶液中 10 分鐘。
- (3) 把玻片架由 xylene 溶液換至 95%酒精中 10 分鐘，將殘餘的蠟沖洗乾淨。
- (4) 再將玻片架由 95%酒精換到含有 120 mL xylene 之玻璃缸內 10 分鐘。
- (5) 最後把玻片架由 xylene 溶液換至另一缸之 120 mL xylene 溶液中 10 分鐘，並進行封片處理。
- (6) 自 xylene 玻璃缸中取出一片載玻片，並吸取 100 μ L 封片膠(50 % Entellen, 50 % xylene)滴在載玻片中央形成一條帶。
- (7) 取一乾淨蓋玻片，托住使傾斜 45° 慢慢放下，讓封片膠慢慢展開，並蓋住所有切片組織，注意避免氣泡產生。
- (8) 處理好之玻片，置於平面玻片板上，約一天後封片膠可完全乾燥即完成封片。

5. 荷爾蒙抑制劑之處理

5.1. 茉莉酸生合成抑制劑之處理

由 Peña-Cortés 等人在 1993 年之研究指出 Aspirin 可以抑制蕃茄中因創傷而增加的內生茉莉酸含量，利用 Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck, Germany) 溶劑以溶解 Aspirin。於水稻種子黑暗催芽 2 天後，分別處理 0、1、10 及 100 μ M Aspirin (Sigma, USA) 且置於白光(90 μ mol $m^{-2}s^{-1}$) 下觀察，另外處理一組全黑暗作為實驗對照。於光照處理 2-3 天(4-5 DAI) 時，以照相及統計水稻種子根之波動百分比方式以觀察

Aspirin 對於 TCN1 水稻之種子根部形態之影響。

水稻種子黑暗催芽 2 天後，分別處理 0 及 1 μM Aspirin 且置於白光($90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)、紅光($90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)及藍光($30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)下觀察。於光照處理 2-3 天(4-5 DAI)時，以照相及統計水稻種子根之波動百分比方式以觀察 Aspirin 於不同光質處理下對 TCN1 水稻種子根部形態之影響。

5.2. 生長素之極向運移蛋白(polar transporters)抑制劑之處理

已知 N-1-naphthylphthalamic acid (NPA)可以抑制植物體中生長素之極向運輸(polar auxin transport)(Goldsmith, 1977)，利用 Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck, Germany)溶劑以溶解 NPA。

已知 NPA 會抑制水稻種子根之延長，因此於光照產生波動現象前 1 天進行 NPA 處理。水稻種子黑暗催芽 2 天且於白光($90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)處理 1 天(3 DAI)後，分別處理 0、1 及 10 μM NPA (Fluka, Germany)，另外處理一組全黑暗作為實驗對照。

6. 水稻茉莉酸生合成相關基因之選殖

已知茉莉酸生合成途徑中之主要參與酵素包括丙二烯氧化合酶(Allene oxide synthase, AOS)及 12-oxophytodienoic acid reductase (OPR)。由 Haga and Iino(2004)發現水稻至少具有 4 個 *OsAOS* 基因，分別命名為 *OsAOS1*, 2, 3 及 4，本實驗以 RT-PCR 之方式選殖水稻中之 4 個 *OsAOS* cDNA 之部分片段。另外，參考 Jiang 等人(2007)於水稻中所設計之 *OsOPR1*、*OsRMC* 及 *RSOsPR10* 基因。所使用之引子如下表所示：

RT-PCR引子列表

Gene	Accession number	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Amplicon size (bp)	Annealing temperature(°C)
Ubiquitin	D12629	CGCAAGTACAACCAGGACAA	TGGTTGCTGTGACCACACTT	101	60°C
<i>OsAOS1</i>	AB116527	TGGAGCTAGTAGCTAGCTCG	GCGACGCGAACGAGATGCAA	98	60°C
<i>OsAOS2</i>	AY310358	TTCAACCTCCGCCGTCAATC	GCCATGCAAGAATTCAGGTACG	133	60°C
<i>OsAOS3</i>	AK107161	CTCCTCGAACCAACCCAACA	AGCGGATGAAATGAGAGTAC	61	60°C
<i>OsAOS4</i>	AK105964	ATGCATGGTCGCTGTCAGTTG	ACACAATGACAAACCGAATCC	137	60°C
<i>OsOPR1</i>	AB040743	ATCAGATTATCGCCGTTTCG	CAGCCACCACCTTGTTCC	253	60°C
<i>OsRMC</i>	AY847141	CGGAGGTGTACCCGTTGTACA	ATTTGTGCCATTTTATTCTAGCTTCA	93	60°C
<i>RSOsPR10</i>	AB127580	GATGGGGGGTCAATCAAAAC	TGTCACGTGCGACTTGAGCT	120	60°C

6.1. 反轉錄聚合酶連鎖反應 (Reverse-transcription polymerase chain reaction; RT-PCR)

以光照處理 3 天(水稻種子浸潤 5 天)之台中在來 1 號水稻種子根的總 RNA 作為模板，以 QIAGEN one step RT-PCR kit (QIAGEN, USA) 進行反轉錄聚合酶連鎖反應。RT-PCR 反應總體積為 25 μ L (5 μ L 5X buffer, 5 μ L 5X Q buffer, 0.04 mM dNTP, 0.8 μ M forward primer, 0.8 μ M reverse primer, 2 μ L enzyme mix, 10U RNasin)，反應程序為 50°C 反轉錄 30 分鐘，94°C 變性 15 分鐘，擴增反應為 94°C 1 分鐘、58°C 1 分鐘、72°C 1 分鐘，循環數為 40，最後以 72°C 反應 10 分鐘。取 10 μ L 反應液加入 1 X loading dye 於 1.5 % 的瓊脂膠體中，以 100 伏特電壓進行電泳。確認正確的片段大小後，將 cDNA 片段交於基隆米克斯公司進行定序。定序結果利用 NCBI align

two sequences 進行比對。

6.2. 接合反應 (Ligation)

上述經 RT-PCR 所擴增出的 *OsAOS3* cDNA 部分片段以 pGEM®-T Easy vector systems (Promega, USA) 選殖至 pGEM®-T Easy 載體。反應總體積為 10 μ L (1X ligation buffer, 3 U T4 DNA ligase, 50 ng pGEM®-T Easy vector, insert DNA)。

6.3. 大腸桿菌轉型 (Transformation)

- (1) 將勝任細胞 (JM 109 strain) 取出於冰上回溫。
- (2) 將接合反應後的質體 10 μ L 加入勝任細胞中混合，置於冰中 30 分鐘。
- (3) 移至 42 °C 加熱 1.5 分鐘。
- (4) 迅速置於冰中 2 分鐘。
- (5) 加入 200 μ L LB 液體培養基，於 37 °C 水浴槽培養 30 分鐘。
- (6) 先將 4 μ L 1 M isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) 與 40 μ L 20 mg/mL 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-D-galactopyranoside (X-gal) 塗抹於含有 50 μ g/mL ampicillin 的 LB 固體培養基上，再將菌液塗抹於培養基。
- (7) 於 37 °C 培養箱培養 16 小時

6.4. 利用 PCR 反應確認基因片段

由轉型作用後的 LB 固體培養基挑取白色單一菌落進行 PCR 反應，以確認 *OsAOS3* cDNA 是否成功轉型於 pGEM®-T Easy 載體上。PCR 反應總體積為 20 μ L (0.2 mM dNTP, 2.5 U Taq DNA polymerase, 1X buffer, 1.25 μ M forward primer, 1.25 μ M reverse primer)，反應程序為 94 °C 5 分鐘，擴增反應為 94 °C 1 分鐘、52 °C 1 分鐘、72 °C 1 分鐘，循環數為 30，最後以 72 °C 反應 10 分鐘。取 10 μ L 反應液加入 1 X loading dye 於 1.5 % 的瓊脂膠體中，以 100 伏特電壓進行電泳。確認正確的片

段大小後，將質體交於基隆米克斯公司進行定序。定序結果利用 NCBI align two sequences 進行比對。

7. 基因表現分析

7.1. 總 RNA 的萃取

- (1) 取水稻種子之種子根，以液態氮急速冷凍，保存於-80°C。
- (2) 以液態氮預冷研鉢，將 0.1 g 材料放入研鉢中，以液態氮將之研磨成粉末。
- (3) 加入 1 mL Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA)混合均勻，待研鉢中的樣品恢復至液態時，將萃取液吸取至微量離心管。
- (4) 室溫靜置 5 分鐘。
- (5) 以 7,830 Xg、4°C 離心 5 分鐘。
- (6) 取上清液至新的微量離心管，加入 0.2 mL chloroform (Riedel-de Haen)，均勻混合 3 分鐘。
- (7) 以 11,270 Xg、4°C 離心 15 分鐘。
- (8) 小心取出上清液至新的微量離心管，加入 0.5 mL 100 % Isopropanol (Fluka) 混勻，室溫靜置 10 分鐘，以 13,230 Xg、4°C 離心 15 分鐘。
- (9) 去除上清液，加入 1 mL 75 % 酒精清洗沉澱物。
- (10) 以 13,230 Xg、4°C 離心 15 分鐘。
- (11) 去除酒精，以真空乾燥機乾燥 10 分鐘。
- (12) 以 100 μ L 含 0.1% diethyl pyrocarbonate (DEPC, Sigma, USA) 的 dH₂O 水加入萃取好的 RNA，於 37°C 乾浴槽進行溶解 30 分鐘。
- (13) 以 9,750 Xg、4°C 離心 3 分鐘，取上清液 95 μ L。
- (14) 以分光光度計測量 RNA 濃度。

7.2. TURBO DNase 處理

利用 TURBO DNA-free™ kit (Ambion,USA) 去除 RNA 樣品中殘存的 genomic DNA。

- (1) 取 6 µg RNA 樣品, 1X TURBO DNase buffer 及 2U TURBO DNase, 總反應體積至少為 40 µl。
- (2) 37°C 反應 30 分鐘。
- (3) 加入 4 µL Inactivation Reagent 於室溫作用 2 分鐘。
- (4) 以 10,000 Xg、4°C 離心 2 分鐘, 取上清液至微量離心管保存於-20°C。

7.3. RNA 電泳

- (1) 取 1 µg 總 RNA 於微量離心管, 並加入 10 µL denature buffer (15 mL Formamide, 0.6 mL Formaldehyde, 3 mL 10X 3-N-morpholino propanesulfonic acid (MOPS, Amresco), Ethidium bromide (Sigma))。
- (2) 於 65°C 加熱 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 diametetraacetic acid (EDTA, Merck), 0.01% DEPC, pH7)) 及電泳溶液(1% MOPS)。
- (5) 以 50 伏特電壓進行 1 小時電泳。

7.4. 即時反轉錄聚合酶連鎖反應(real-time RT-PCR)

使用 Brilliant® SYBR® Green QRT-PCR Master Mix Kit (Stratagene, USA), 並以 Stratagene MX3000P™ 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, 並於適當的黏合溫度下進行片段的擴增。Real-time RT-PCR 反應總

體積為 25 μ L (200 ng RNA template, 1X master mix, 0.5 μ M forward primer, 0.5 μ M reverse primer, 30 nM reference dye, 1 μ L StrataScript RT/RNase Block Enzyme Mixture)，反應程序為 50 $^{\circ}$ C 反轉錄 30 分鐘，95 $^{\circ}$ C 變性 10 分鐘，擴增反應為 95 $^{\circ}$ C 1 分鐘、60 $^{\circ}$ C 1 分鐘、72 $^{\circ}$ C 1 分鐘，循環數為 40 個。進行 real-time RT-PCR 偵測基因表現時，以 *Ubiquitin* 基因作為 internal control，利用 Ct 值計算出相對表現量 (Relative quantitation)，計算方式如下所示：

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



結果

1. 不同水稻品種在光照及黑暗處理下其根部之生長形態

為了瞭解不同水稻品種在種子發芽過程中，光照處理對水稻根部生長形態之影響，因此分別選取私型稻品種之台中在來 1 號(TCN1)及稈型稻品種之台農 67 號(TNG67)作為實驗材料。為了避免不同品種間發芽勢的差異，因此將台中在來 1 號(TCN1)及台農 67 號(TNG67)水稻黑暗催芽 2 天，直到胚根突出種皮至 0.1- 0.3 公分時再進行自然光照、人工白光及黑暗處理。實驗結果顯示在光照處理 2 天(水稻種子浸潤 4 天)時，TCN1 不論是在自然光照或是白光處理下，其種子根靠近根尖的部位會產生波動形態，而黑暗處理下則不具有此波動現象發生；另一水稻品種 TNG67 不論是在光照或是黑暗處理下，其種子根不具有波動形態之發生，且具有波動形態之種子根與無此現象之種子根相比亦較粗。此外，TCN1 在光照處理下會明顯抑制種子根之延長，此光照種子根之長度與黑暗相比則抑制 2.7%；然而 TNG67 水稻種子根受光照抑制為 1.5%。由此可知 TCN1 與 TNG67 水稻對光反應之敏感程度有所不同(圖一)。

2. 其他影響水稻根部產生波動形態之因子

2.1. 於黑暗環境下空氣中相對濕度對水稻根部形態之影響

TCN1 及 TNG67 水稻在黑暗且空氣相對濕度為 40-50%之環境下，其水稻種子根會筆直地向下生長；然而若生長在黑暗且較高的相對濕度環境(90-95%)下時，則 TCN1 及 TNG67 水稻種子根會產生捲曲形態(圖二)，由此可知空氣相對濕度可能也會影響水稻根部產生向上捲曲形態之因子。另一方面，空氣相對濕度在 40-50%之環境下，無論是 TCN1 或是 TNG67 水稻種子根之延長速率均比培養在 90-95% 的空氣相對濕度環境下生長較快。

2.2. 蔗糖處理對水稻根部形態之影響

將 TCN1 及 TNG67 於黑暗催芽 2 天後，分別處理 0% 及 3% 的蔗糖濃度且培養在光照環境下 2 天(4 DAI)時，以觀察蔗糖是否會影響水稻根部之生長且改變水稻種子根的波動形態。由實驗結果發現於光照環境下處理蔗糖時，會抑制 TCN1 及 TNG67 水稻種子根之生長；然而蔗糖處理並不會影響 TCN1 水稻種子根於光照下所產生的波動形態，且 TNG67 水稻種子根亦不具有波動形態之發生(圖三)。

2.3. 光照處理下水稻根尖澱粉體之分析

為了解光照誘導 TCN1 水稻種子根產生波動形態，是否是因根尖感應重力之澱粉體含量改變，我們利用碘染的方式觀察 TCN1 水稻種子根在光照及黑暗環境下，根冠組織中的澱粉體含量是否有所差異。於黑暗催芽 2 天後的 TCN1 水稻種子，分別進行光照及黑暗處理且於光照處理 2 天(4 DAI)時，將 TCN1 水稻種子根進行碘染，由染色結果指出光照及黑暗處理之根冠組織，其澱粉體含量沒有明顯差異；另一方面，從碘染 1 分鐘及 2 分鐘的照相結果可以發現在光照處理下之 TCN1 水稻種子根，其吸收碘液的速率較黑暗處理快(圖四)，因此推測光照處理下可能會影響 TCN1 水稻種子根吸收水分或養分之速率。

3. 感應光源訊息之組織部位

植物的光形態發生首先是藉由植物組織感應光源訊號，進而影響植物體中之訊息傳遞過程，導致最終的光形態反應。因此我們想知道光照誘導 TCN1 水稻種子根產生波動形態是否是藉由地上部感應光源訊息，而傳遞至地下部造成波動形態之發生，或是根部本身感應光訊息以產生波動形態。將黑暗催芽 2 天之 TCN1 及 TNG67 水稻之地上部處理白光($100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)，而根部則進行遮光處理，另外，進行一組全光照處理作為實驗對照。由實驗結果顯示 TCN1 水稻於全光照處理 2 天(水稻種子浸潤 4 天)時，其種子根產生波動形態，而根部遮光處理之幼苗，其種

子根不具有波動形態之發生，且種子根之生長速度與全光照處理相比則明顯變快。TNG67 水稻無論在全光照或是根部遮光處理，其種子根均不會產生波動形態，且根部遮光處理之水稻種子根，其生長速度亦較全光照處理快 (圖五)。

故由實驗證實光照誘導 TCN1 水稻種子根產生波動形態，並不是藉由地上部感應光源訊息而傳遞至種子根，可能是藉由水稻種子根直接感應光源訊息，進而促使 TCN1 種子根產生波動形態之發生。

4. 光照對台中在來 1 號(TCN1)水稻根部細胞大小之影響

已知光照是誘導 TCN1 水稻種子根產生波動形態之重要因子，且光照亦會抑制種子根之生長速率；另一方面，Wang 等人(2002)之研究指出光照會引起水稻根部細胞產生不對稱生長，進而使根部產生背光性反應。因此我們想進一步了解光照是否會影響水稻根部細胞之形態變化，進而使 TCN1 水稻種子根於光照下產生波動形態。將 TCN1 水稻種子根於光照處理 2 天(4 DAI)時，利用石蠟切片進行水稻根部細胞之觀察，且分別測量中柱細胞之左右兩側細胞長度，以一個水稻根部的 15 個細胞長度作為 1 重複且進行 3 次重複數，而結果指出中柱細胞之凸面細胞平均長度為 $49.91 \pm 2.4 \mu\text{m}$ ，而凹面細胞平均細胞長度為 $32.39 \pm 1.6 \mu\text{m}$ ，以 T-test 分析中柱細胞之凸面與凹面細胞的平均長度其顯示具有顯著性差異(圖六)。

故由實驗結果推測光照可能會促使 TCN1 水稻根部的中柱細胞之左右兩側細胞產生不對稱生長，進而造成 TCN1 水稻種子根產生波動形態。

5. 光質及光強度對水稻波動根形態之影響

5.1. 光質對台中在來 1 號(TCN1)根部形態之影響

上述實驗之光照處理均為白光，而白光之光波長為全光譜，因此我們想進一步了解不同光質對 TCN1 種子根產生波動形態之影響。將黑暗催芽 2 天之 TCN1

分別處理紅光($90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)、藍光($90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)、白光($90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)之處理。於光照處理 1-3 天(3-5 DAI)時進行實驗觀察。光照處理 1 天(3 DAI)時, TCN1 水稻在不同光質處理下,其種子根均不具有波動形態之發生,而光照處理 2-3 天(4-5 DAI)時, TCN1 水稻在紅光($90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)處理下其種子根具有捲曲(curling)形態之發生,在白光($90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)處理下則 TCN1 水稻種子根產生波動(waving)形態,而 TCN1 水稻種子根在藍光($90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)處理下則不具有捲曲及波動形態之產生(圖七)。故由實驗結果推測紅光可能會促進 TCN1 水稻種子根產生捲曲形態之發生,而白光處理下會誘導 TCN1 水稻種子根產生波動形態。另一方面,紅光及藍光處理下均會抑制水稻種子根之延長,然而在藍光下此光抑制種子根之延長速率與紅光相比則較為明顯。

5.2. 光強度對台中在來 1 號(TCN1)根部形態之影響

由上述實驗結果顯示紅光、藍光及白光處理下會造成 TCN1 水稻種子根形態上之差異,將 TCN1 水稻種子於不同光強度之紅光、藍光及白光下處理 2-3 天(4-5 DAI),以了解光照強度是否會影響根部波動及捲曲形態之發生。將黑暗催芽 2 天之 TCN1 水稻分別處理不同光照強度,於紅光(30 、 60 、 90 及 $140 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)、藍光(5 、 15 、 30 、 60 及 $90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)及白光 (30 、 50 、 100 、 140 及 $180 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)之光照處理 1-3 天(3-5 DAI)時進行實驗觀察。於白光處理 1 天(3 DAI)時,可以發現高光強度($180 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)處理下具有較高的波動百分比,而白光處理 2-3 天(4-5 DAI)時,則不同光強度下均有 80-95%的根部出現波動形態(表一)。紅光處理 3 天(5 DAI)時,TCN1 水稻於不同光照強度下其種子根均具有捲曲形態之發生,且其產生捲曲形態之百分比達到 80-90%(附圖一)。藍光處理 3 天(5 DAI)時,TCN1 水稻於不同光照強度下其種子根之形態有所差異,其中在 60 及 $90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 之藍光強度下,其 TCN1 水稻不具有波動形態之發生且會抑制種子根之延長,而 5 、 15 及 $30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 之藍光強度下,則 TCN1 水稻種子根產生波動形態達到 30-50%(附

圖二)。

6. 植物荷爾蒙對水稻根部產生波動形態之影響

6.1. 茉莉酸生合成抑制劑(Aspirin)之影響

本研究利用 Aspirin 以抑制水稻內生之茉莉酸(jasmonic acid, JA)生合成途徑，進而了解 JA 是否會參與 TCN1 水稻種子根產生波動形態之調控。TCN1 水稻種子於黑暗催芽 2 天後，並進行白光處理開始時即添加 0、1、10 及 100 μM 濃度之 Aspirin，且於白光處理 2 天(4 DAI)時，分別統計在不同 Aspirin 濃度處理下，其 TCN1 水稻種子根產生波動形態之百分比。於白光處理 2 天(4 DAI)時，不添加 Aspirin 之處理下 TCN1 水稻種子根具有 70%之波動百分比，而添加 1、10 及 100 μM Aspirin 則此波動現象明顯降低，其波動百分比分別為 15%、22%及 8%(圖九)。

由先前研究指出紅光會促使 TCN1 水稻種子根產生捲曲之形態發生，而低藍光強度下則會誘導 TCN1 水稻種子根產生捲曲及波動形態，且上述實驗結果顯示 1 μM Aspirin 處理下即可降低 TCN1 水稻種子根之波動百分比，因此本實驗於紅光($90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)及低藍光($30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)處理下添加 1 μM Aspirin，以進一步了解茉莉酸是否會影響紅光及低藍光下所造成 TCN1 水稻種子根之波動及捲曲形態；實驗結果指出於光照處理 3 天(5 DAI)時，無 Aspirin 處理之紅光及低藍光下其發生捲曲及波動形態之百分比為 50%及 76.7%，而處理 1 μM Aspirin 之紅光及低藍光下則會明顯降低捲曲及波動形態之百分比分別為 0%及 20%(圖十)。

故由實驗結果指出 Aspirin 可以減緩 TCN1 水稻種子根於紅光、低藍光及白光誘導下所產生之捲曲及波動形態，因此推測 JA 生合成反應可能為參與光照誘導 TCN1 水稻種子根產生捲曲及波動形態之條件。

6.2. 茉莉酸合成基因參與 TCN1 種子根產生波動形態之調控

6.2.1. 茉莉酸專一性引子的設計

由上述實驗結果顯示 JA 可能會參與 TCN1 水稻種子根於光照環境下所產生之波動及捲曲形態之發生，因此我們想進一步了解光照是否會影響水稻種子根中茉莉酸合成基因 *OsAOS* 及 *OsOPRI* 之表現，進而促使水稻種子根產生捲曲及波動之形態發生。

已知水稻中至少具有 4 個 *OsAOS* 基因且其家族基因序列具有高相似性，因此分別將 *OsAOS1*, *OsAOS3* 基因之引子設計在含 5' 端包含 coding region 及 UTR (untranslated region) 的區域，而 *OsAOS2*, *OsAOS4* 基因之引子則設計在含 3' 端包含 coding region 及 UTR 的區域(圖十一-A)。因此利用 RT-PCR 選殖 *OsAOS* 家族基因之 cDNA 片段以確認引子之專一性及產物之正確性(圖十一-B)。

6.2.2. 於不同光質處理下茉莉酸之相關基因的表現

將 TCN1 水稻種子於黑暗催芽 2 天後，分別進行紅光($90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)、白光($90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)及黑暗處理 1-3 天(3-5 DAI)，並收取 TCN1 水稻種子根以進行 *OsAOS* 家族基因之表現分析，其結果顯示 *OsAOS1* 於紅光及白光處理 1 天(3 DAI)時，其表現量與黑暗相比無明顯差異，於紅光及白光處理 2 天(4 DAI)時，*OsAOS1* 基因之表現與黑暗相比則會分別被提高至 2.3 倍及 3 倍，以 T-test 分析顯示白光處理與黑暗處理達顯著性差異，而光照處理 3 天(5 DAI)時，則紅光及白光所誘導 *OsAOS1* 之表現消失。*OsAOS2* 於紅光及白光處理 1 天(3 DAI)時，其基因表現與黑暗相比無明顯差異，於光照處理 2 天(4 DAI)時，*OsAOS2* 於紅光及白光處理下與黑暗相比會被誘導表現且增加 3.8 倍及 2.6 倍，於光照處理 3 天(5 DAI)時，*OsAOS2* 之表現量於紅光及白光處理下與黑暗相比則被提高至 2.7 倍及 1.4 倍，而 T-test 結果顯示紅光處理與黑暗具有顯著性差異。*OsAOS3* 之基因表現於紅光及白光處理 1 天(3 DAI)時會被誘導表現，且紅光及白光之表現量與黑暗相比分別增加 5.7 倍及 11.1 倍，

以 T-test 分析結果顯示 *OsAOS3* 在紅光及白光處理下與黑暗相比具有顯著性差異，於光照處理 2 天(4 DAI)時，*OsAOS3* 於紅光及白光處理下與黑暗相比會誘導 *OsAOS3* 之表現，其分別增加 2.8 倍及 3 倍，T-test 分析顯示白光處理與黑暗處理達顯著性差異，於光照處理 3 天(5 DAI)時，*OsAOS3* 於紅光及白光處理下與黑暗相比會誘導 *OsAOS3* 之表現，其分別增加 4.3 倍及 3.5 倍，T-test 分析顯示紅光及白光處理與黑暗處理達顯著性差異。而 *OsAOS4* 於紅光及白光處理 1-3 天(3-5 DAI)時，其表現量與黑暗相比沒有明顯差異(圖十二)。本研究也進行茉莉酸生合成途徑 *OsOPRI* 基因，於紅光($90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)、白光($90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)及黑暗處理 1-3 天(3-5 DAI)之 TCN1 水稻種子根之表現，結果顯示於光照處理 1-2 天(3-4 DAI)時 *OsOPRI* 基因會受到紅光及白光處理而誘導其表現，而光照處理 3 天(5 DAI)時則紅光及白光誘導 *OsOPRI* 基因表現之現象消失，以 T-test 分析 *OsOPRI* 於紅光及白光處理 1-2 天(3-4 DAI)與黑暗相比達顯著性差異(圖十三)。

另一方面，Jiang 等人(2007)之研究亦指出 *OsRMC* 基因會負向調控水稻根部產生捲曲形態之發生，然而我們尚未清楚光照對 *OsRMC* 基因之影響，因此本研究進一步探討 *OsRMC* 基因在光照誘導 TCN1 水稻種子根產生波動形態之調控為何。此外，已知水稻根部中的 *PR10* 基因(*RSOsPR10*)，在鹽害及乾旱逆境下會被誘導表現，且其參與在 JA 訊息傳導路徑中(Hashimoto et al., 2004)，故本研究進一步偵測 TCN1 水稻種子根中 *RSOsPR10* 基因在不同光質處理下是否會誘導其表現，以證實 TCN1 水稻種子根在光照處理下會促使 JA 含量上升。由實驗結果顯示 *OsRMC* 基因在紅光及白光處理 1 天(3 DAI)時，其表現量與黑暗相比會被抑制 3.1 倍及 2.8 倍，以 T-test 分析 *OsRMC* 於紅光及白光處理 1 天(3 DAI)之表現與黑暗相比達顯著性差異，在紅光及白光處理 2 天(4 DAI)時，則 *OsRMC* 基因表現與黑暗相比無明顯差異，在白光處理 3 天(5 DAI)時，*OsRMC* 基因表現量則會被抑制 2.1 倍，而在紅光處理下則與黑暗無明顯差異，由此可知光照會抑制 TCN1 水稻種子根中 *OsRMC* 基因之表現。*RSOsPR10* 基因於紅光及白光處理 2 天(4 DAI)時，其表現量與黑暗相

比則會被誘導表現且分別增加 2.2 倍及 3 倍，故可知光照會促使 TCN1 水稻種子根中 JA 含量上升(圖十四)。

於先前在不同光質處理之實驗結果顯示紅光及白光會誘導 TCN1 水稻種子根產生捲曲及波動形態，而在基因表現之結果顯示 JA 生合成途徑之 *OsAOS* 家族基因及 *OsOPR1* 會受到紅光及白光處理而誘導表現；另一方面，JA 訊息傳導路徑之 *RSOsPR10* 基因於光照下會被誘導表現，且光照下會抑制 *OsRMC* 基因之表現，而 *OsRMC* 會負向調控水稻根部產生捲曲形態，故綜合以上實驗結果可進一步證實 JA 及 JA 生合成反應可能是參與 TCN1 水稻種子根產生波動及捲曲形態之條件。此外，*OsAOS* 家族基因除了受紅光及白光影響之外，由實驗結果亦可發現植物生長發育時期可能會調控 *OsAOS* 之表現，如 *OsAOS2* 基因於黑暗、紅光及白光處理下，則其表現會隨著發育時期而逐漸增加，而 *OsAOS3* 基因於紅光處理下亦有相同之現象，由此可以得知 *OsAOS2* 及 *OsAOS3* 可能隨著植物生長發育時期而有不同表現之趨勢。

6.3. 生長素極向運移抑制劑(NPA)之影響

已知生長素(Auxin)會影響植物根部之生長形態，而生長素極向運移系統會調控生長素流動之方向(Teale et al., 2006; Michniewicz et al., 2007)；由文獻研究指出 N-1-naphthylphalamic acid (NPA) 為生長素流出載體蛋白之抑制劑(Hertel et al., 1983)；且光照會調控生長素流出蛋白於細胞內的分佈(Laxmi et al., 2008)。故本研究在 TCN1 水稻種子根於光照環境下使用 NPA 處理，以破壞水稻根部之生長素極向運移，進而了解光照是否會影響生長素極向運移蛋白質之不對稱分佈，而改變生長素在根部之含量，造成 TCN1 水稻種子根產生波動形態。TCN1 水稻種子於黑暗催芽 2 天後進行白光處理 1 天(3 DAI)時，分別處理 0 μ M、1 μ M 及 10 μ M 之 NPA 濃度並觀察其對 TCN1 種子根之影響，另外也進行黑暗處理作為實驗對照組。由結果顯示於光照處理 2 天(4 DAI)時，無 NPA 處理下 TCN1 水稻種子根產生波動形

態，而外加 1 及 10 μM NPA 處理下則此波動現象消失。另一方面，外加 NPA 處理之 TCN1 水稻種子根，其根尖會略有偏離重力方向之現象，而此現象與黑暗環境下處理 NPA 之結果相同(圖十五)。

由實驗結果可知外加 NPA 處理會破壞根部生長素的極向運移，導致光照誘導 TCN1 水稻種子根產生的波動現象消失，且 NPA 亦可能會影響根部之向地性反應，進而造成根尖向側邊偏移。因此推測在光照環境下，可能會影響 TCN1 水稻種子根中生長素極向運移蛋白質之不對稱分佈，進而改變生長素的側向重新分配之流量，故造成 TCN1 水稻種子根產生波動形態。



討論

1. 不同品種之遺傳背景差異

在此論文中，我們發現私型稻品種之台中在來 1 號(TCN1)在全光照環境下，會誘導其種子根產生波動形態，而粳型稻品種之台農 67 號(TNG67)則不具有此現象發生；此外，光照亦會抑制水稻種子根之延長且不同水稻品種對光抑制的程度也會有所不同(圖一)。Chhun 等人(2007)之研究顯示 IR8 (*Oryza sativa* L. ssp. indica) 水稻幼苗培養在持續白光($100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)及空氣相對飽和濕度(100%)的環境下，會誘導水稻根部產生捲曲形態；而 Shimizu 等人(2009)之研究亦發現水稻種子 (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare)於持續光照且添加 0.1 mM 之氮濃度下，會促使種子根產生盤繞(coiled)之形態發生且抑制水稻種子根之延長，然而在無添加氮素之光照環境下則無盤繞現象之發生，由此推測不同水稻品種其對光訊息的敏感程度或訊息傳導途徑可能有所不同。另一方面，由過去文獻研究顯示不同水稻品種其根系形態會有所不同，如粳型稻的根部較粗且具有較寬的導管，而私型稻的根較細且導管較窄(Lafitte et al., 2001)，Uga 等人(2009)之研究亦證實私型稻及粳型稻之遺傳背景差異會改變其根系形態的不同。此外，不同水稻品種其對環境反應之敏感程度也會有所差異，如私型稻品種對低溫環境較為敏感，而粳型稻品種則對低溫反應較具有抗性(Coly, 1980)；Hsu 及 Kao (2003)之研究指出台中在來 1 號(TCN1)及台農 67 號(TNG67)對重金屬鎘之耐受性也不相同，其中台農 67 號(TNG67)對重金屬鎘之處理較具有耐受性(Hsu and Kao, 2003)；Maloof 等人(2001)之研究也指出不同的阿拉伯芥品種其對光的敏感程度也會有所差異，導致其生長及發育形態的不同。由此可知不同品種的物種其本身具有遺傳上的差異，使其對光及環境反應的敏感程度不同，導致其生長及形態上具有明顯之差異。

2. 影響根部波動形態之因子

本研究發現 TCN1 與 TNG67 水稻幼苗若生長在黑暗及高空氣相對濕度 (90-95%) 環境下時，其會促使水稻根部產生捲曲形態(圖二)，而此現象與 Chhun 等人(2007)之研究顯示水稻生長在空氣相對飽和濕度下會誘導水稻根部產生捲曲形態之結果相符合。然而在先前實驗結果顯示只有在光照環境下才會誘導 TCN1 水稻種子根產生波動形態，且 TNG67 無論在光照或黑暗環境下則無波動形態之發生，由此可知濕度可能也是參與水稻種子根產生捲曲形態之訊息因子，且其訊息傳導途徑可能與光照訊息途徑有所不同。

本研究發現 TCN1 水稻種子根在光照處理下具有波動形態之發生而 TNG67 則無，且本試驗沒有添加任何養分處理下即可觀察到波動形態(圖一)。Shimizu 等人(2009)之研究發現水稻種子(*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare)在持續光照且添加 0.1 mM 之氮濃度下，會促使種子根產生盤繞(coiled)之形態發生，然而在無添加氮素之光照環境下則無盤繞現象之發生；此外，在光照環境下添加氮素時，會提高光照抑制水稻種子根之延長，而此現象會隨著氮濃度的提高而更加明顯。Tanaka 等人(1993)之研究亦證實提高氮素含量會抑制水稻種子根的延長。另外在阿拉伯芥之研究指出添加 OS salt (low N)之培養基，其會促使根部生長速率變快，進而降低根部波動之頻率；此外，在沒有營養成分之培養基中添加蔗糖處理會降低根部之波動頻率，而在含有 OS salt (low N)之培養基中處理蔗糖則會提高根部之波動頻率 (Buer et al., 2003; Osmont et al., 2007)。然而水稻種子根在光照及外加氮素環境下所產生的盤繞(coiled)形態與本研究所觀察的波動(waving)形態有所不同，因此可知水稻種子根形態上的差異可能與水稻品種及氮含量之添加有關。另外本研究在光照下添加蔗糖之結果顯示於蔗糖處理下會抑制水稻種子根之延長，但不會影響水稻根部波動形態之發生(圖三)，而此結果與阿拉伯芥波動根之相關研究有所差異，因此推測不同物種對蔗糖之反應會有所不同，且氮素與糖類之間可能會互相作用進而影響根部波動及盤繞形態之發生。

在阿拉伯芥相關研究顯示重力及阻礙物之刺激，會誘導其根部產生波動形態 (Okada, 1990; Simmons, 1995)，且已知重力與光照彼此會互相作用以影響植物根部的向地性及向光性反應(Hangarter, 1997; Correll and Kiss, 2002)，而根冠內之澱粉體可以感應重力訊息，以活化訊息調控因子造成根部形態之改變(Hangarter, 1997; Sedbrook et al., 1998; Rosen et al., 1999; Correll and Kiss, 2002)。本研究利用碘染方式初步觀察在光照環境下 TCN1 水稻種子根的澱粉體含量是否與黑暗下有所差異，其結果顯示在光照下不會影響 TCN1 水稻種子根中的澱粉體含量，但是在光照下則會提高水稻根部對碘液之吸收速率(圖四)。Sasakawa 及 Yamamoto (1979)之研究指出水稻白化苗在紅光、遠紅光及藍光照射下會提高硝酸還原酶(nitrate reductase)的活性，且紅光處理下會輕微地增加白化苗對硝酸的吸收。另一方面，在豌豆之實驗結果顯示光照會促進葉片對鉀離子的吸收(Nobel, 1969)；由此可以推測光照處理下可能會影響 TCN1 水稻種子根吸收水分或養分之速率，但不會影響澱粉體在根部累積的情況。

3. 光訊息對 TCN1 水稻根部細胞之影響及其感應機制

先前文獻研究顯示植物可以藉由維管束組織傳遞光源訊息而使植物根部產生光形態發生(Sun et al., 2003; Sun et al., 2005)；另一方面，Wilkins 及 Wain(1974)之研究指出根冠具有感應光訊息之功能。而本研究利用根部遮光處理之實驗結果顯示水稻根部本身可以感應光照訊息，進而使 TCN1 水稻種子根產生波動形態(圖五)。此外，在水稻及玉米移除根冠的相關研究證實根冠為感應白光所誘導根部產生負向光性(negative phototropism)之區域(Mullen et al., 2002; Wang et al., 2002)。Shimizu 等人在 2009 年利用 phytochromes 水稻突變體之相關研究，進一步指出光抑制水稻種子根之生長主要是藉由 PHYA 及 PHYB 所調控，而且利用蛋白質分析之研究亦證實水稻根部中具有 phytochromes 之存在(Shimizu et al., 2009)；而阿拉伯芥之相關研究亦顯示 phytochromes 會在阿拉伯芥的根尖細胞表現(Salisbury et al.,

2007); Galen 等人(2007)之研究亦證實 phototropin-1 存在於阿拉伯芥的種子根及側根中。故可知在植物根部細胞中具有光源接受器之存在，而使植物根部可以感應光源訊息以產生光形態發生。

已知光照為促使 TCN1 水稻種子根產生波動形態之因子;且於 Wang 等人(2002)之研究指出光照會引起水稻根部細胞之不對稱生長，進而使根部產生負向光性反應。本實驗利用石蠟切片方式以觀察光照對水稻根部細胞形態之影響，結果顯示於光照環境下會改變根部中柱細胞之左右兩側細胞生長長度，導致根部細胞產生不對稱生長，促使 TCN1 水稻種子根產生波動形態(圖六)。已知施予高濃度生長素會抑制根部細胞之生長，反之在低濃度下則會促進細胞生長，若將 IAA 處理於水稻根尖時，會促使水稻根尖朝向 IAA 處理之部位彎曲，而經 IAA 處理的根部細胞其會明顯抑制細胞長度，且會促使水稻根部朝向 IAA 處理之方向彎曲(Wang et al., 2002; Mo et al., 2004)。因此推測生長素可能會參與 TCN1 水稻幼苗於光照環境下產生波動形態之調控，藉由改變根部細胞之大小，而引起根部細胞之不對稱生長。

4. 光質及光強度對 TCN1 水稻波動根之影響

由文獻研究顯示光質及光強度會影響植物的光合作用和生長發育過程，如種子發芽和開花等(Sullivan and Deng, 2003; Franklin et al., 2005)。本研究分別以不同光質處理，進行 TCN1 水稻種子根形態變化之觀察，結果顯示白光($90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)會誘導 TCN1 水稻種子產生波動形態，紅光($90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)會促使 TCN1 水稻種子根產生捲曲形態，而藍光($90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)處理下則會抑制此波動及捲曲形態之發生(圖七)。在阿拉伯芥根部之相關研究指出紅光會誘導根部產生正向光性反應，而藍光則會使其產生負向光性反應(Ruppel et al., 2001; Kiss et al., 2003);此外，在水稻分蘖研究顯示紅光及遠紅光處理下會抑制水稻根部細胞的延長，而藍光處理下則會抑制根部細胞的延長及分裂(Ohno and Fujiwara, 1967)，由此可知不同光質處理下對根部形態之影響有所不同，故光質在植物根部的訊息傳導途徑可能也會有所差

異。

目前已知光照強度也會影響植物的生理代謝及生長，例如在低光照強度下玉米根部的乾物質累積速率會變慢(Lambers and Posthumus, 1980)；而水稻根部的負向光性反應會隨著光照強度增加而提高根部的彎曲角度(Wang et al., 2002)。本研究針對白光、紅光及藍光的光照強度進行 TCN1 水稻種子根之形態觀察，結果顯示白光及紅光的光照強度並不會影響 TCN1 水稻種子根的波動及捲曲形態(圖八、附圖一)，而在 60 及 90 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的藍光光照強度下則不具有波動形態發生，在 5、15 及 30 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的藍光光照強度則會誘導 TCN1 水稻種子根產生波動形態(附圖二)，因此推測 TCN1 水稻種子根對藍光光照強度的反應較為敏感，故導致不同藍光的光照強度下其根部形態有明顯的差異。Matsuda 等人(2007)之研究顯示藍光強度($100\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)會促進菠菜葉片之光合作用效率，且增加每單位葉面積之葉片氮含量。Seibert 等人(1975)之研究顯示在近 UV 光的波長範圍其光強度會影響菸草癒傷組織的生長及芽分化，且藍光處理下會促進癒傷組織的生長及芽分化，而紅光及遠紅光則不會影響，故可知光質及光強度會影響植物的生長及發育。

5. 植物荷爾蒙對 TCN1 水稻種子根產生波動形態之影響

Jiang 等人(2007)之研究指出 *OsRMC* 會負向調控水稻根部產生盤繞形態之訊息調控因子，且其參與在 JA 訊息傳導路徑上，因此 JA 可能會參與水稻根部產生盤繞形態之發生，Hashimoto 等人(2004)之研究亦指出 *RSOsPR10* 為水稻根部專一性且參與在 JA 訊息傳導路徑之基因；而由先前之研究顯示紅光會誘導水稻葉片中 JA 生合成途徑 *OsaOS* 及 *OsOPRI* 基因之表現(Riemann et al., 2003; Haga and Iino, 2004)；然而先前文獻研究並未指出光照對水稻根部產生波動及捲曲形態之影響，因此本研究分別利用植物荷爾蒙抑制劑及 real-time RT-PCR 之分析，以了解光訊息對水稻根部形態之調控。本研究利用 Aspirin 抑制水稻內生的 JA 含量，實驗結果顯示外加 Aspirin 會降低紅光、白光及低藍光所誘導 TCN1 水稻種子根產生波動形

態的百分比(圖九、圖十)，因此我們進一步利用 real-time RT-PCR 分析 TCN1 水稻種子根中 *OsAOS* 家族基因、*OsOPR1*、*OsRMC* 及 *RSOsPR10* 基因之表現，其結果顯示紅光及白光會提高 *OsAOS1-3*、*OsOPR1* 及 *RSOsPR10* 基因之表現，且白光會抑制 *OsRMC* 基因的表現量(圖十二、圖十三、圖十四)。而本實驗於紅光及白光處理下會促使 TCN1 水稻種子根產生捲曲及波動形態，此結果與 JA 生合成及 JA 訊息傳導基因之表現結果相符合，另一方面，在先前文獻研究顯示 *OsRMC* 會負向調控水稻根部捲曲形態之發生，因此推測光照下會抑制 *OsRMC* 基因表現且促進水稻根部中 JA 含量上升，進而促使 TCN1 水稻根部產生波動及捲曲形態，由此可知 JA 及 JA 生合成反應可能為參與 TCN1 水稻種子根於光照下產生波動及捲曲形態之條件。

已知 NPA 會抑制生長素流出載體蛋白的活性(Hertel et al., 1983)，因此本研究利用 NPA 破壞水稻根部之生長素極向運移蛋白，其會抑制光照誘導 TCN1 水稻種子根產生的波動形態(圖十五)，且從石蠟切片的結果也推測生長素可能會使根部細胞產生不對稱的生長(圖六)。由文獻研究指出光照會調控生長素流出載體蛋白於細胞膜上的分佈(Blakeslee et al., 2004; Laxmi et al., 2008)；且生長素流出載體蛋白具有調控生長素極性運輸之方向(Michniewicz et al., 2007)；此外，光照與生長素之相關研究也指出，光照會影響植物中生長素氧化酶(IAA oxidase)的活性，進而改變植物內生的生長素含量(Galston and Baker, 1951; Hillman and Galston, 1957)。因此可以推測在光照下可能會影響水稻根部中生長素載體蛋白於細胞膜上之分佈或改變細胞中生長素的含量，進而影響生長素的側向分配流量造成根部細胞之不對稱生長，導致 TCN1 水稻種子根產生波動形態。

已知植物荷爾蒙在植物中會彼此互相調控，如 JA 可以抑制 IAA 所誘導燕麥及玉米之鞘葉的伸長生長(Ueda et al., 1994; Irving et al., 1999)，故 JA 與 IAA 可能會負向相互影響彼此之作用；Gutjahr 等人(2005)之研究亦指出，JA 和 IAA 會互相作用而影響水稻鞘葉的向地性反應。然而目前尚未十分清楚在植物根部中，生長素

或生長素轉運蛋白與茉莉酸之間是否會互相調控根部的生長形態。

6. 結語及未來展望

綜合本研究之結果顯示(1)於水稻種子發芽過程中，光照會誘導 TCN1 水稻種子根產生波動形態，且 TCN1 與 TNG67 水稻對光反應之敏感程度有所不同；(2)根部為直接感應光訊息之部位，且光照會改變根部中柱細胞之兩側細胞產生不對稱生長，進而使 TCN1 水稻種子根產生波動形態；(3)在不同光質處理下發現，紅光及白光會促使 TCN1 水稻種子根產生捲曲及波動形態；(4)利用 Aspirin 及 NPA 之荷爾蒙抑制劑處理均會抑制光照誘導 TCN1 水稻種子根之波動形態，且進一步分析茉莉酸生合成及訊息途徑之相關基因表現顯示，紅光及白光處理會誘導 *OsAOS*、*OsOPR1* 及 *RSOsPR10* 之表現。由此可知茉莉酸生合成及生長素極向運移反應為光照誘導 TCN1 水稻種子根產生捲曲及波動形態所必須之條件(圖十六)。

已知不同水稻品種對感應光的反應程度有所不同，而本實驗室之研究亦發現不同秈稻品種於光照下其誘導種子根產生波動形態具有程度上之差異；且實驗結果發現光質會影響 TCN1 水稻根部之形態變化，然而我們尚未清楚藍光對 TCN1 水稻種子根的作用機制。故未來需要進一步探討的研究為(1)在不同水稻品種中分析其 JA 生合成基因是否亦有程度上之改變，以了解不同水稻品種其種子根在光照下所產生的波動形態是否是藉由 JA 所調控；(2)進一步分析不同藍光的光強度對 JA 訊息調控之影響且調整紅光加藍光之比例，以了解光質對 TCN1 水稻種子根產生捲曲及波動形態之調控機制；(3)探討水稻種子於發芽期間產生波動根形態是否與環境適應性有所關聯。

參考文獻

- Agrawal GK, Rakwal R, Jwa NS, Han KS, Agrawal VP** (2002) Molecular cloning and mRNA expression analysis of the first rice jasmonate biosynthetic pathway gene allene oxide synthase. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 771-782
- Bates TR, Lynch JP** (2000) Plant growth and phosphorus accumulation of wild type and two root hair mutants of *Arabidopsis thaliana* (*Brassicaceae*). *American Journal of Botany* **87**: 958-963
- Bennett MJ, Marchant A, Green HG, May ST, Ward SP, Millner PA, Walker AR, Schulz B, Feldmann KA** (1996) *Arabidopsis AUX1* gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* **273**: 948-950
- Blakeslee JJ, Bandyopadhyay A, Peer WA, Makam SN, Murphy AS** (2004) Relocalization of the PIN1 auxin efflux facilitator plays a role in phototropic responses. *Plant Physiology* **134**: 28-31
- Boccalandro HE, De Simone SN, Bergmann-Honsberger A, Schepens I, Fankhauser C, Casal JJ** (2008) PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE1 regulates root phototropism and gravitropism. *Plant Physiology* **146**: 108-115
- Briggs WR, Christie JM** (2002) Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends in Plant Science* **7**: 204-210
- Buer CS, Wasteneys GO, Masle J** (2003) Ethylene modulates root-wave responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **132**: 1085-1096
- Casal JJ** (2000) Phytochromes, cryptochromes, phototropin: photoreceptor interactions in plants. *Photochemistry and Photobiology* **71**: 1-11
- Chhun T, Uno Y, Taketa S, Azuma T, Ichii M, Okamoto T, Tsurumi S** (2007) Saturated humidity accelerates lateral root development in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings by increasing phloem-based auxin transport. *Journal of Experimental Botany* **58**: 1695-1704
- Clark LJ, Cope RE, Whalley WR, Barraclough PB, Wade LJ** (2002) Root penetration of strong soil in rainfed lowland rice: comparison of laboratory screens with field performance. *Field Crops Research* **76**: 189-198
- Clark LJ, Whalley WR, Barraclough PB** (2003) How do roots penetrate strong soil? *Plant and Soil* **255**: 93-104
- Coly A** (1980) Testing rice varieties of indica type for cold tolerance at seedling stage. *Japanese Journal of Crop Science* **49**: 543-547
- Correll MJ, Kiss JZ** (2002) Interactions between gravitropism and phototropism in plants. *Journal of Plant Growth Regulation* **21**: 89-101
- Creelman RA, Mullet JE** (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: 355-381

- Dolan L** (1998) Pointing roots in the right direction: the role of auxin transport in response to gravity. *Genes and Development* **12**: 2091-2095
- Dolan L, Janmaat, K, Willemsen, V, Linstead, P, Poethig, S, Roberts, K** (1993) Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* **119**: 71-84
- Feldman LJ** (1984) Regulation of root development. *Annual Reviews Plant Physiology* **35**: 223-242
- Feldman LJ, Briggs WR** (1987) Light-regulated gravitropism in seedling roots of maize *Plant Physiology* **83**: 241-243
- Foehse D, Jungk A** (1983) Influence of phosphate and nitrate supply on root hair formation of rape, spinach and tomato plants. *Plant and Soil* **74**: 359-368
- Franklin KA, Larner VS, Whitelam GC** (2005) The signal transducing photoreceptors of plants. *International Journal of Developmental Biology* **49**: 653-664
- Friml J, Wisniewska J, Benkova E, Mendgen K, Palme K** (2002) Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* **415**: 806-809
- Gälweiler L, Guan C, Muller A, Wisman E, Mendgen K, Yephremov A, Palme K** (1998) Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* **282**: 2226-2230
- Galen C, Rabenold JJ, Liscum E** (2007) Functional ecology of a blue light photoreceptor: effects of phototropin-1 on root growth enhance drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **173**: 91-99
- Galston AW, Baker RS** (1951) Studies on the physiology of light action. III. light activation of a flavoprotein enzyme by reversal of a naturally occurring inhibition. *American Journal of Botany* **38**: 190-195
- Garbers C, DeLong A, Deruère J, Bernasconi P, Söll D** (1996) A mutation in protein phosphatase 2A regulatory subunit A affects auxin transport in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal* **15**: 2115-2124
- Goldsmith MHM** (1977) The polar transport of auxin. *Annual Reviews Plant Physiology* **28**: 439-478
- Gutjahr C, Riemann M, Müller A, Düchting P, Weiler EW, Nick P** (2005) Cholodny-Went revisited: a role for jasmonate in gravitropism of rice coleoptiles. *Planta* **222**: 575-585
- Haga K, Iino M** (2004) Phytochrome-mediated transcriptional up-regulation of *ALLENE OXIDE SYNTHASE* in rice seedlings. *Plant Cell Physiology* **45**: 119-128
- Hangarter RP** (1997) Gravity, light and plant form. *Plant, Cell and Environment* **20**: 796-800

- Hashimoto M, Kisseleva L, Sawa S, Furukawa T, Komatsu S, Koshiba T** (2004) A novel rice PR10 protein, RSOsPR10, specifically induced in roots by biotic and abiotic stresses, possibly via the jasmonic acid signaling pathway. *Plant Cell Physiology* **45**: 550-559
- Hawes MC, Bengough G, Cassab G, Ponce G** (2003) Root caps and rhizosphere. *Journal of Plant Growth Regulation* **21**: 352-367
- Hertel R, Lomax TL, Briggs WR** (1983) Auxin transport in membrane vesicles from *Cucurbita pepo* L. *Planta* **157**: 193-201
- Hillman WS, Galston AW** (1957) Inductive control of indoleacetic acid oxidase activity by red and near infrared light. *Plant Physiology* **32**: 129-135
- Hsu YT, Kao CH** (2003) Accumulation of ammonium ion in cadmium tolerant and sensitive cultivars of *Oryza sativa*. *Plant Growth Regulation* **39**: 271-276
- Iijima M, Higuchi T, Barlow PW, Bengough AG** (2003) Root cap removal increases root penetration resistance in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany* **54**: 2105-2109
- Irving HR, Dyson G, McConchie R, Parish RW, Gehring CA** (1999) Effects of exogenously applied jasmonates on growth and intracellular pH in maize coleotile segments. *Journal of Plant Growth Regulation* **18**: 93-100
- Jain M, Sharma P, Tyagi SB, Tyagi AK, P. KJ** (2007) Light regulation and differential tissue-specific expression of phototropin homologues from rice (*Oryza sativa* ssp. indica). *Plant Science* **172**: 164-171
- Jiang J, Li J, Xu Y, Han Y, Bai Y, Zhou G, Lou Y, Xu Z, Chong K** (2007) RNAi knockdown of *Oryza sativa* root meander curling gene led to altered root development and coiling which were mediated by jasmonic acid signaling in rice. *Plant, Cell and Environment* **30**: 690-699
- Jiao Y, Lau OS, Deng XW** (2007) Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nature Reviews Genetics* **8**: 217-230
- Kiss JZ, Correll MJ, Mullen JL, Hangarter RP, Edelman RE** (2003) Root phototropism: how light and gravity interact in shaping plant form. *Gravitational and Space Biology Bulletin* **16(2)**: 55-60
- Lafitte HR, Champoux MC, McLaren G, O'Toole JC** (2001) Rice root morphological traits are related to isozyme group and adaptation. *Field Crops Research* **71**: 57-70
- Lambers H, Posthumus F** (1980) The effect of light intensity and relative humidity on growth rate and root respiration of *Plantago lanceolata* and *Zea mays*. *Journal of Experimental Botany* **31**: 1621-1630
- Laxmi A, Pan J, Morsy M, Chen R** (2008) Light plays an essential role in intracellular distribution of auxin efflux carrier PIN2 in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* **3**:

- Lee SH, Tewari RK, Hahn EJ, Paek KY** (2007) Photon flux density and light quality induce changes in growth, stomatal development, photosynthesis and transpiration of *Withania Somnifera* (L.) Dunal. plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **90**: 141-151
- Linkohr BI, Williamson LC, Fitter AH, Leyser HMO** (2002) Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **29**: 751-760
- Liung KL, Hull AK, Celenza J, Yamada M, Estelle M, Normanly J** (2005) Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *The Plant Cell* **17**: 1090-1104
- Maloof JN, Borevitz JO, Dabi T, Lutes J, Nehring RB, Redfern JL, Trainer GT, Wilson JM, Asami T, Berry CC, Weigel D, Chory J** (2001) Natural variation in light sensitivity of *Arabidopsis*. *Nature Genetics* **29**: 441-446
- Mandoli DF, Ford GA, Waldron LJ, Nemson JA, Briggs WR** (1990) Some spectral properties of several soil types: implications for photomorphogenesis. *Plant, Cell and Environment* **13**: 287-294
- Massa GD, Gilroy S** (2003) Touch modulates gravity sensing to regulate the growth of primary roots of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **33**: 435-445
- Mathews S, Sharrock RA** (1996) The phytochrome gene family in grasses (Poaceae): a phylogeny and evidence that grasses have a subset of the loci found in dicot angiosperms. *Molecular Biology and Evolution* **13**: 1141-1150
- Matsuda R, Ohashi-Kaneko K, Fujiwara K, Kurata K** (2007) Analysis of the relationship between blue-light photon flux density and the photosynthetic properties of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves with regard to the acclimation of photosynthesis to growth irradiance. *Soil Science and Plant Nutrition* **53**: 459-465
- Matsumoto N, Hirano T, Iwasaki T, Yamamoto N** (2003) Functional analysis and intracellular localization of rice cryptochromes. *Plant Physiology* **133**: 1494-1503
- Michniewicz M, Brewer PB, J. F** (2007) Polar auxin transport and asymmetric auxin distribution. *The Arabidopsis Book*: 1-28
- Mo YW, Wang Z, Qian SQ, Gu YJ** (2004) Effect of indoleacetic acid (IAA) on the negative phototropism of rice root. *Rice Science* **11**: 125-128
- Mochizuki S, Harada A, Inada S, Sugimoto-Shirasu K, Stacey N, Wada T, Ishiguro S, Okada K, Sakai T** (2005) The Arabidopsis WAVY GROWTH 2 protein modulates root bending in response to environmental stimuli. *Plant Cell* **17**: 537-547

- Molas ML, Kiss JZ, Correll MJ** (2006) Gene profiling of the red light signalling pathways in roots. *Journal of Experimental Botany* **57**: 3217-3229
- Moons A, Prinsen E, Bauw G, Van Montagu M** (1997) Antagonistic effects of abscisic acid and jasmonates on salt stress-inducible transcripts in rice roots. *The Plant Cell* **9**: 2243-2259
- Mueller MJ** (1997) Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis. *Physiologia Plantarum* **100**: 653-663
- Mullen JL, Wolverton C, Ishikawa H, Hangarter RP, Evans ML** (2002) Spatial separation of light perception and growth response in maize root phototropism. *Plant, Cell and Environment* **25**: 1191-1196
- Nguyen HT, Babu RC, Blum A** (1997) Breeding for drought resistance in rice: physiology and molecular genetics considerations. *Crop Science* **37**: 1426-1434
- Nhan DQ, Thaw S, Matsuo N, Mochizuki T** (2006) Root penetration ability of vietnamese traditional upland rice varieties. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University* **51**: 245-249
- Nobel PS** (1969) Light-dependent potassium uptake by *Pisum sativum* leaf fragments. *Plant Cell Physiology* **10**: 597-605
- Nye PH, Tinker PB, Boast CW** (1979) Solute movement in the soil-root system. *Soil Science* **127**: 254
- Ohno Y, Fujiwara A** (1967) Photoinhibition of elongation growth of roots in rice seedlings. *Plant Cell Physiology* **8**: 141-150
- Okada K, Shimura, Y** (1990) Reversible root tip rotation in *Arabidopsis* seedlings induced by obstacle-touching stimulus. *Science* **250**: 274-276
- Osmont KS, Sibout R, Hardtke CS** (2007) Hidden branches: developments in root system architecture. *Annual Review of Plant Biology* **58**: 93-113
- Oyama T, Shimura Y, Okada K** (1997) The *Arabidopsis* *HY5* gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. *Genes and Development* **11**: 2983-2995
- Pan Z, Camara B, Gardner HW, Backhaus RA** (1998) Aspirin inhibition and acetylation of the plant cytochrome P450, allene oxide synthase, resembles that of animal prostaglandin endoperoxide H synthase. *The Journal of Biological Chemistry* **273**: 18139-18145
- Pandey S, Monshausen GB, Ding L, Assmann SM** (2008) Regulation of root-wave response by extra large and conventional G proteins in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **55**: 311-322
- Peña-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

- Pjon CJ, Furuya M** (1967) Phytochrome action in *Oryza sativa* L. I. Growth responses of etiolated coleoptiles to red, far-red and blue light. *Plant Cell Physiology* **8**: 709-718
- Poerwanto R, Inoue H, Kataoka I** (1989) Effects of temperature on the morphology and physiology of the roots of trifoliolate orange budded with satsuma mandarin. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **58**: 267-274
- Raven JA** (1975) Transport of indoleacetic acid in plant cells in relation to pH and electrical potential gradients, and its significance for polar IAA transport. *New Phytologist* **74**: 163-172
- Rebouillat J, Dievart A, Verdeil JL, Escoute J, Giese G, Breitler JC, Gantet P, Espeout S, Guiderdoni E, Perin C** (2009) Molecular genetics of rice root development. *Rice* **2**: 15-34
- Reed RC, Brady SR, Muday GK** (1998) Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **118**: 1369-1378
- Riemann M, Muller A, Korte A, Furuya M, Weiler EW, Nick P** (2003) Impaired induction of the jasmonate pathway in the rice mutant *hebiba*. *Plant Physiology* **133**: 1820-1830
- Rosen E, Chen R, Masson PH** (1999) Root gravitropism: a complex response to a simple stimulus? *Trends in Plant Science* **4**: 407-412
- Rubery PH, Sheldrake AR** (1974) Carrier-mediated auxin transport. *Planta* **188**: 101-121
- Ruppel NJ, Hangarter RP, Kiss JZ** (2001) Red light induced positive phototropism in *Arabidopsis* roots. *Planta* **212**: 424-430
- Sack F** (1997) Plastids and gravitropic sensing. *Planta* **203**: S63-S68
- Salisbury FJ, Hall A, Grierson CS, Halliday KJ** (2007) Phytochrome coordinates *Arabidopsis* shoot and root development. *The Plant Journal* **50**: 429-438
- Santner AA, Watson JC** (2006) The WAG1 and WAG2 protein kinases negatively regulate root waving in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **45**: 752-764
- Sasakawa H, Yamamoto Y** (1979) Effects of red, far red, and blue light on enhancement of nitrate reductase activity and on nitrate uptake in etiolated rice seedlings. *Plant Physiology* **63**: 1098-1101
- Schaller F** (2001) Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signalling molecules. *Journal of Experimental Botany* **52**: 11-23
- Sedbrook J, Boonsirichai K, Chen R, Hilson P, Pearlman R, Rosen E, Rutherford R, Batiza A, Carroll K, Schulz T, Masson PH** (1998) Molecular genetics of root gravitropism and waving in *Arabidopsis thaliana*. *Gravitational and Space Biology Bulletin* **11**: 71-78

- Seibert M, Weyherbee PJ, Job DD** (1975) The effects of light intensity and spectral quality on growth and shoot initiation in tobacco callus. *Plant Physiology* **56**: 130-139
- Sharrock RA, Quail PH** (1989) Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: Structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes and Development* **3**: 1745-1757
- Shimizu H, Tanabata T, Xie X, Inagaki N, Takano M, Shinomura T, Yamamoto KT** (2009) Phytochrome-mediated growth inhibition of seminal roots in rice seedlings. *Physiologia Plantarum* **137**: 289-297
- Simmons C, Soll, D, Migliaccio, F** (1995) Circumnutation and gravitropism cause root waving in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **46**: 143-150
- Sullivan JA, Deng XW** (2003) From seed to seed: the role of photoreceptors in *Arabidopsis* development. *Developmental Biology* **260**: 289-297
- Sun Q, Yoda K, Suzuki H** (2005) Internal axial light conduction in the stems and roots of herbaceous plants. *Journal of Experimental Botany* **56**: 191-203
- Sun Q, Yoda K, Suzuki M, Suzuki H** (2003) Vascular tissue in the stem and roots of woody plants can conduct light. *Journal of Experimental Botany* **54**: 1627-1635
- Takano M, Inagaki N, Xie X, Yuzurihara N, Hihara F, Ishizuka T, Yano M, Nishimura M, Miyao A, Hirochika H, Shinomura T** (2005) Distinct and cooperative functions of phytochromes A, B, and C in the control of deetiolation and flowering in rice. *The Plant Cell* **17**: 3311-3325
- Tanaka S, Yamauchi A, Kono Y** (1993) Response of the seminal root elongation to NH_4 -nitrogen in several rice cultivars. *Japanese Journal of Crop Science* **62**: 288-293
- Tani T, Sobajima H, Okada K, Chujo T, Arimura S, Tsutsumi N, Nishimura M, Seto H, Nojiri H, Yamane H** (2008) Identification of the *OsOPR7* gene encoding 12-oxophytodienoate reductase involved in the biosynthesis of jasmonic acid in rice. *Planta* **227**: 517-526
- Teale WD, Paponov IA, Palme K** (2006) Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**: 847-859
- Torrey JG** (1952) Effects of light on elongation and branching in pea roots. *Plant Physiology* **27**: 591-602
- Turner JG, Ellis C, Devoto A** (2002) The jasmonate signal pathway. *The Plant Cell* **14** Suppl: S153-S164
- Ueda J, Miyamoto K, Aoki M** (1994) Jasmonic acid inhibits the IAA-induced elongation of oat coleoptile segments: a possible mechanism involving the metabolism of cell wall polysaccharides. *Plant Cell Physiology* **35**: 1065-1070

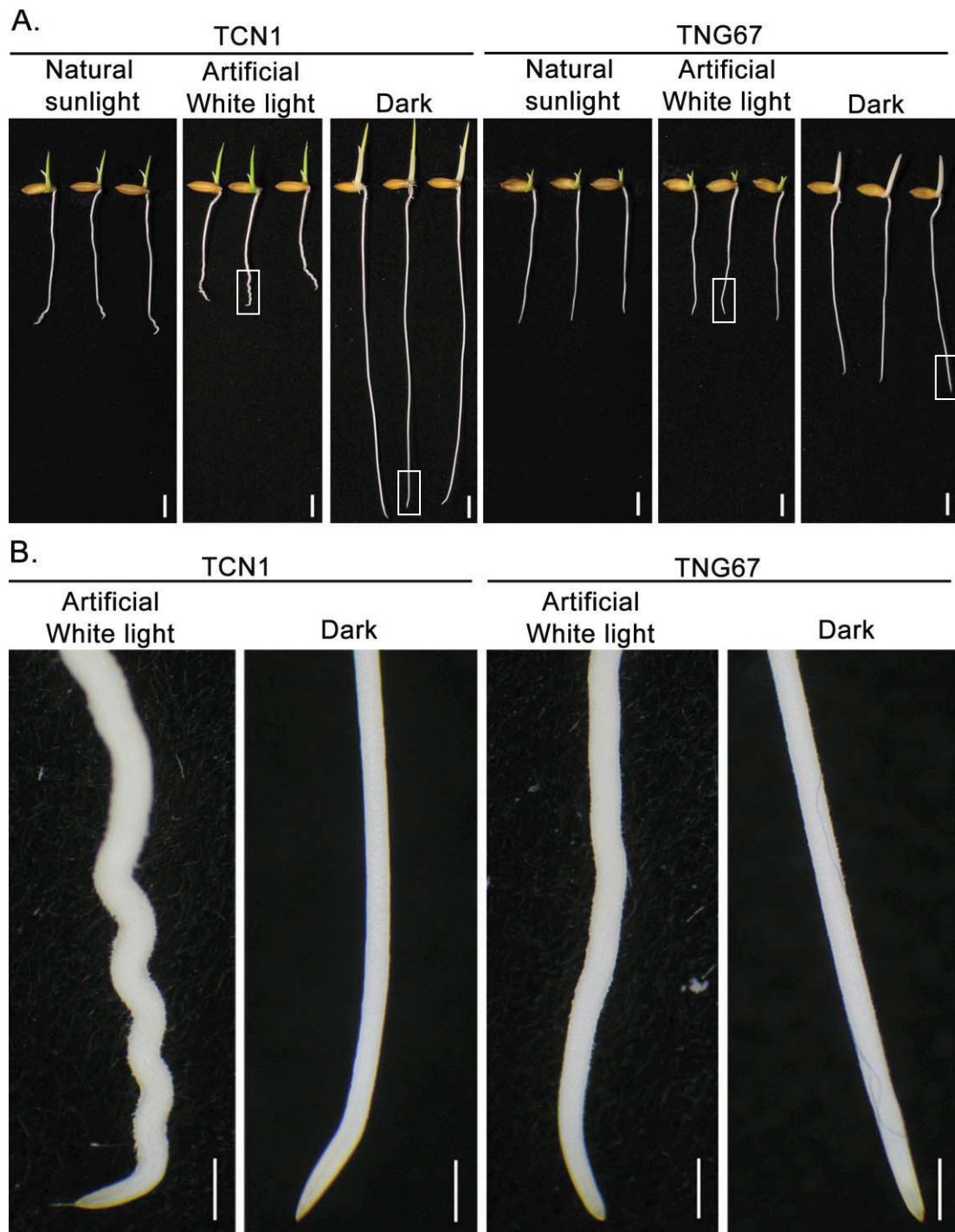
- Uga Y, Ebana K, Abe J, Morita S, Okuno K, Yano M** (2009) Variation in root morphology and anatomy among accessions of cultivated rice (*Oryza sativa* L.) with different genetic backgrounds. *Breeding Science* **59**: 87-93
- Wang S, Ichii M, Taketa S, Xu L, Xia K, Zhou X** (2002) Lateral root formation in rice (*Oryza sativa*): promotion effect of jasmonic acid. *Journal of Plant Physiology* **159**: 827-832
- Wang S, Taketa S, Ichii M, Xu L, Xia K, Zhou X** (2003) Lateral root formation in rice (*Oryza sativa* L.): differential effects of indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid. *Plant Growth Regulation* **41**: 41-47
- Wang Z, Mo YW, Qian SQ, Gu YJ** (2002) Negative phototropism of rice root and its influencing factors. *Science in China* **45**: 485-496
- Wilkins H, Wain RL** (1974) The root cap and control of root elongation in *Zea mays* L. seedling exposed to white light. *Planta (Berl.)* **121**: 1-8
- Wilson AJ, Robards AW, Goss MJ** (1977) Effects of mechanical impedance on root growth in barley, *Hordeum vulgare* L. *Journal of Experimental Botany* **28**: 1216-1227
- Xie X, Shinomura T, Inagaki N, Kiyota S, Takano M** (2007) Phytochrome-mediated inhibition of coleoptile growth in rice: age-dependency and action spectra. *Photochemistry and Photobiology* **83**: 131-138
- Xu M, Zhu L, Shou H, Wu P** (2005) A *PINI* family gene, *OsPINI*, involved in auxin-dependent adventitious root emergence and tillering in rice. *Plant Cell Physiology* **46**: 1674-1681
- Xu T, Zhou Q, Chen W, Zhang G, He G, Gu D, Zhang W** (2003) Involvement of jasmonate-signaling pathway in the herbivore-induced rice plant defense. *Chinese Science Bulletin* **48**: 1982-1987
- Young LM, Evans ML, Hertel R** (1990) Correlations between gravitropic curvature and auxin movement across gravistimulated roots of *Zea mays*. *Plant Physiology* **92**: 792-796
- Zazimalova E, Napier RM** (2003) Points of regulation for auxin action. *Plant Cell Reports* **21**: 625-634
- Zhou D, Yin K, Xu Z, Xue H** (2003) Effect of polar auxin transport on rice root development. *Acta Botanica Sinica* **45**: 1421-1427

表一、不同白光強度下台中在來 1 號(TCN1)水稻種子根之波動百分比

Light intensity	3 DAI	4 DAI	5 DAI
30 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	1.1 \pm 1.1%	90.0 \pm 5.1%	91.1 \pm 2.2%
50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	2.2 \pm 1.1%	92.2 \pm 2.2%	92.2 \pm 2.2%
100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	2.2 \pm 1.1%	92.2 \pm 4.0%	94.4 \pm 2.9%
140 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	2.2 \pm 2.2%	84.4 \pm 4.0%	88.9 \pm 4.0%
180 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	6.7 \pm 1.9%	92.2 \pm 1.1%	95.6 \pm 2.2%

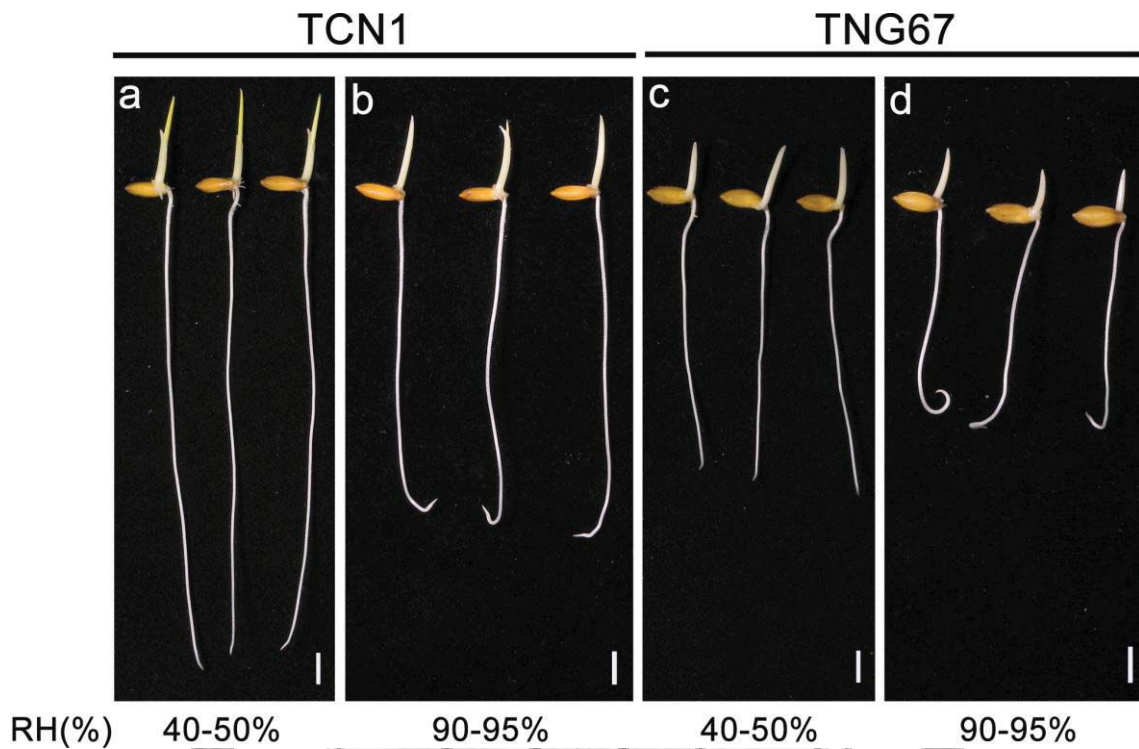
水稻種子於黑暗催芽 2 天後，分別處理不同白光強度為 30, 50, 100, 140, 180 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，且在白光處理 1-3 天(3-5 DAI)時統計 TCN1 水稻種子根之波動百分比。結果為 3 重複之平均值，誤差值以 standard error (S.E.)表示。





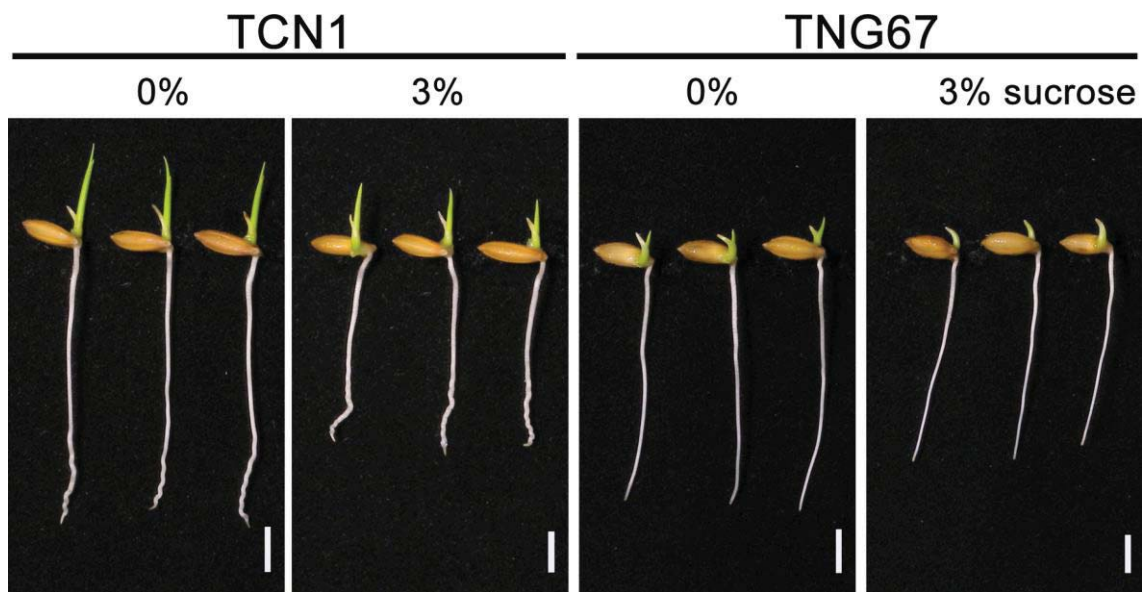
圖一、光照誘導台中在來 1 號(TCN1)種子根產生波動形態。

A. 水稻種子於黑暗催芽 2 天後，進行光照處理 2 天(4 DAI)，而水稻種子分別培養在人工光照處理($100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 28°C)及自然光照室($25/20^\circ\text{C}$)，另外處理一組全黑暗作為實驗對照。每個處理之樣品數各為 30 顆水稻種子，最後取三樣品做為代表呈現結果。B. 為 A 圖方框部分之放大圖。比例尺=5 mm。



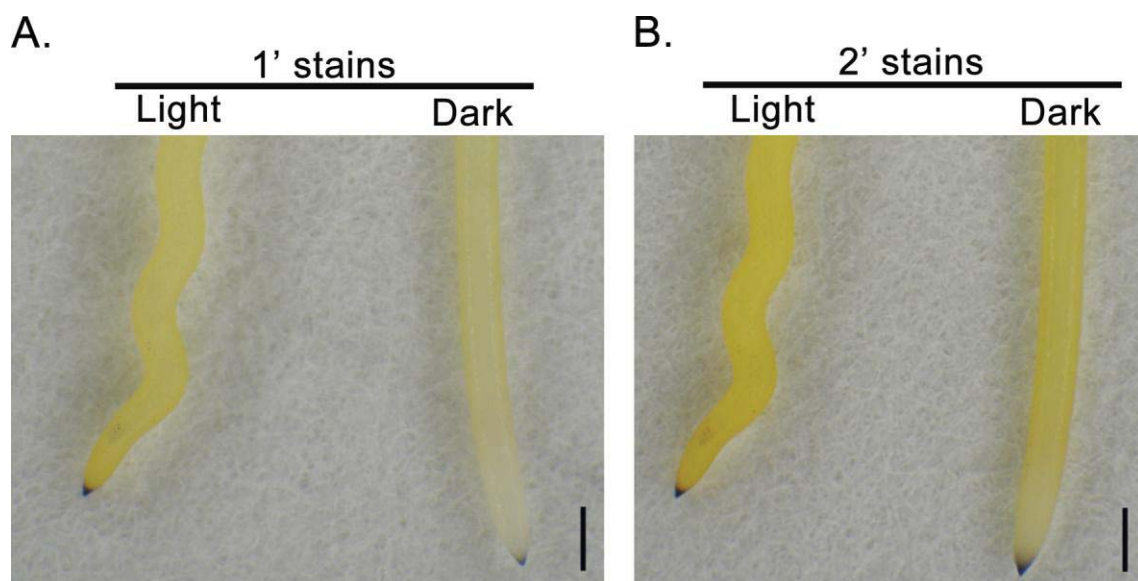
圖二、空氣相對濕度誘導水稻種子根產生捲曲形態。

若將水稻種子培養在黑暗且高濕度環境下4天時，則會造成 TCN1 及 TNG67 水稻種子根產生捲曲形態。(a)為 TCN1 水稻培養在空氣相對濕度 40-50%環境下之根部形態。(b)為 TCN1 水稻培養在空氣相對濕度 90-95%環境下之根部形態。(c)為 TNG67 水稻培養在空氣相對濕度 40-50%環境下之根部形態。(d) 為 TNG67 水稻培養在空氣相對濕度 90-95%環境下之根部形態。每個處理之樣品數各為 30 顆水稻種子，最後取三樣品做為代表呈現結果。比例尺=5 mm。



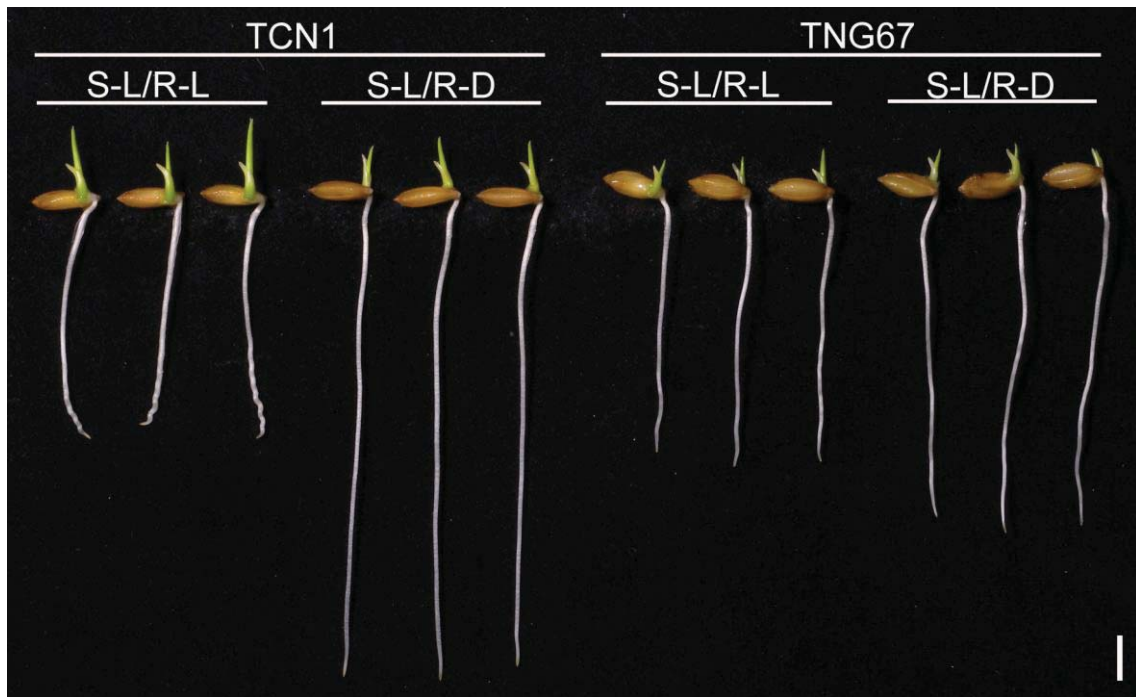
圖三、蔗糖處理對水稻根部形態之影響。

水稻種子於黑暗催芽 2 天後，分別將 TCN1 及 TNG67 水稻處理 0% 及 3% 的蔗糖濃度，並培養在白光下 2 天 (4 DAI) 以觀察糖類對水稻根部形態之影響。每個處理之樣品數各為 30 顆水稻種子，最後取三樣品做為代表呈現結果。比例尺=5 mm。



圖四、光照及黑暗處理對水稻根尖澱粉體之分析。

水稻種子於黑暗催芽 2 天後，分別將 TCN1 進行黑暗及白光處理($100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)。於光照處理 2 天(4 DAI)時將 TCN1 水稻種子根進行碘染觀察，而照片中的左側材料皆為光照處理之波動根，右側材料則為黑暗處理之種子根。A. 為碘染 1 分鐘的染色結果。B. 為碘染 2 分鐘的染色結果。比例尺=1 mm。



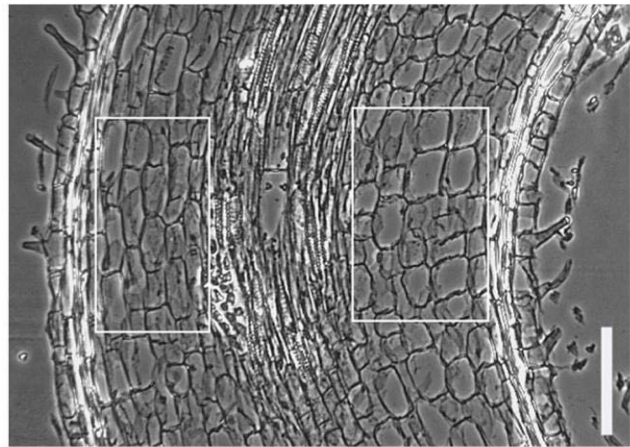
圖五、感應光源之組織部位。

水稻種子於黑暗催芽 2 天後，分別將 TCN1 及 TNG67 進行全光照處理(S-L/R-L, Shoot-Light/Root-Light)及根部遮光處理(S-L/R-D, Shoot-Light/Root-Dark)，水稻種子於光照($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)處理 2 天(4 DAI)進行照像觀察。比例尺=5 mm。

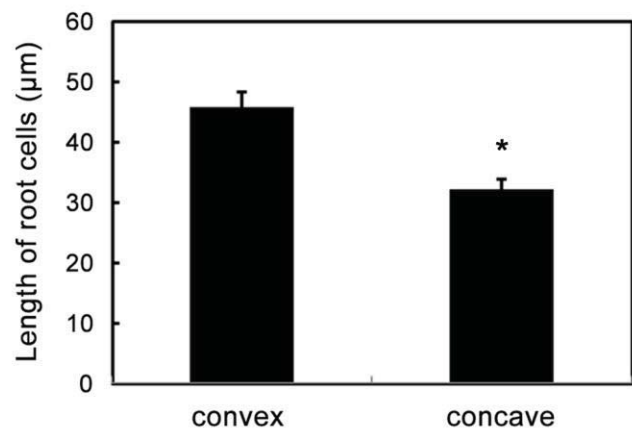
A.



B.

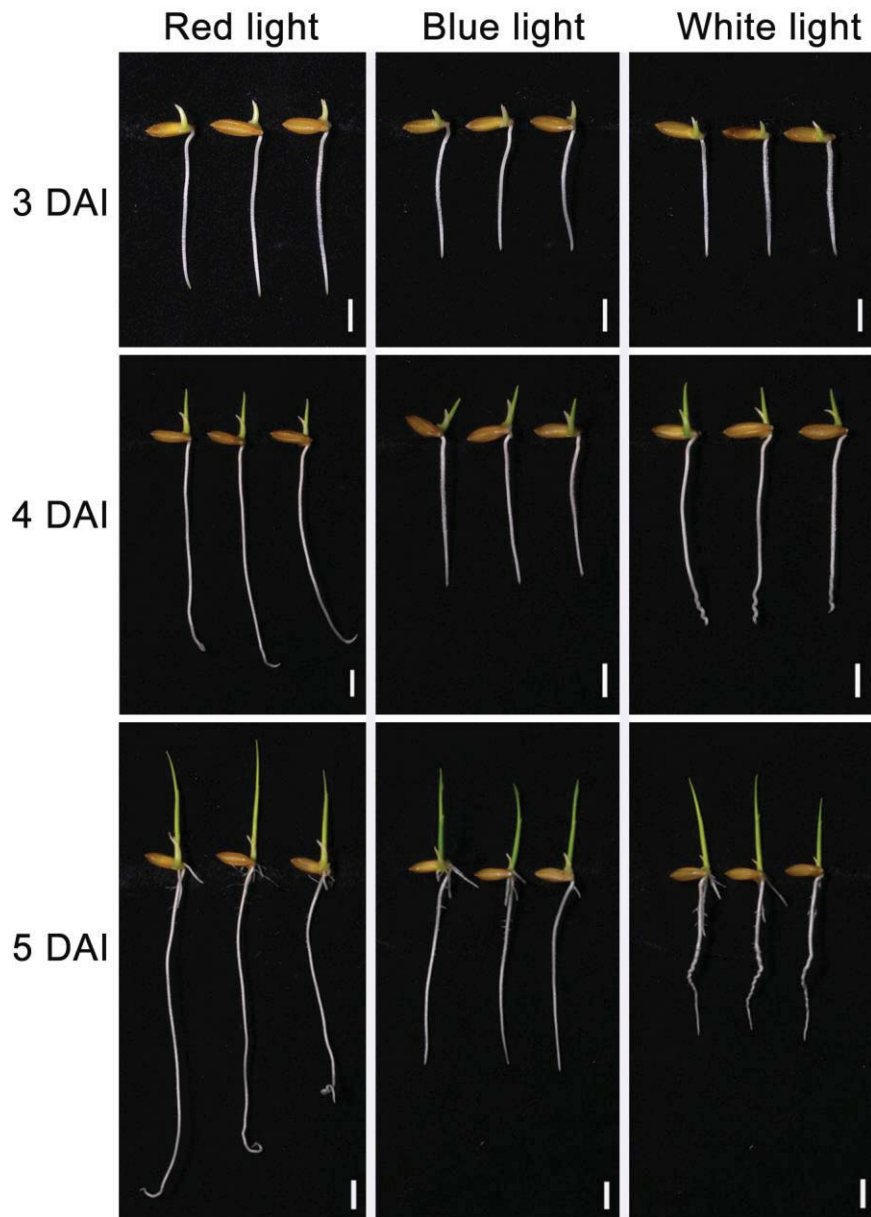


C.



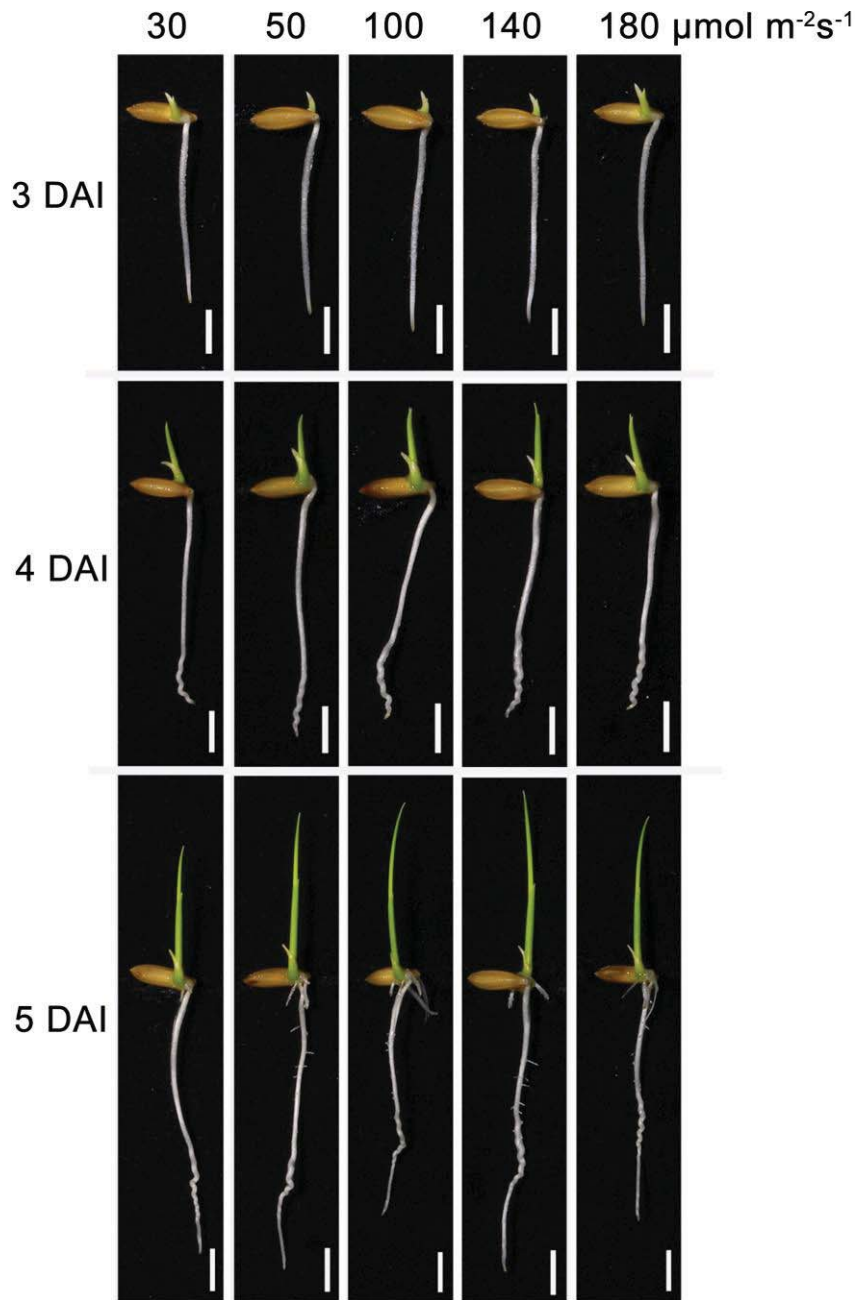
圖六、利用石蠟切片觀察 TCN1 水稻種子根之波動形態。

水稻種子於黑暗催芽 2 天後，分別將 TCN1 進行白光 ($100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) 處理 2 天(4 DAI)，並收取 TCN1 水稻種子根進行石蠟切片觀察。A. 為白光處理之 TCN1 種子根。B. 為 A. 圖產生波動區域之放大圖。C. 為 B. 圖維管束左右兩側在方框中具有完整細胞長度之統計結果($n=15$)。結果為 3 重複之平均值，誤差值以 standard error (S.E.) 表示。以 T-test 將維管素左右兩側之細胞長度進行顯著性分析，* 及 ** 分別表示顯著相關 $p < 0.05$ 與 $p < 0.01$ 。比例尺 = $100 \mu\text{m}$ 。



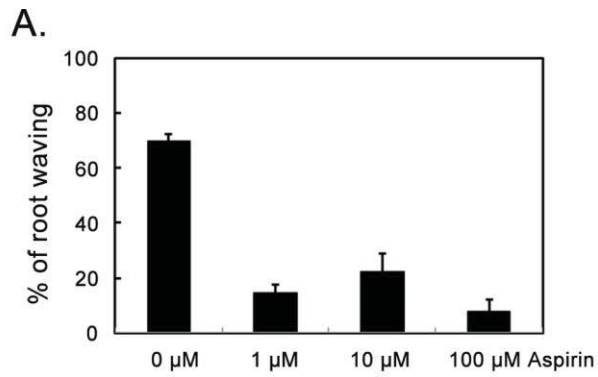
圖七、光質對台中在來 1 號(TCN1)種子根之影響。

TCN1 水稻種子於黑暗催芽 2 天後，分別將 TCN1 水稻種子處理紅光($90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)、藍光($90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)及白光($90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)下 1-3 天(3-5 DAI)並進行照像觀察。每個處理之樣品數各為 30 顆水稻種子，最後取三樣品做為代表呈現結果。比例尺=5 mm。

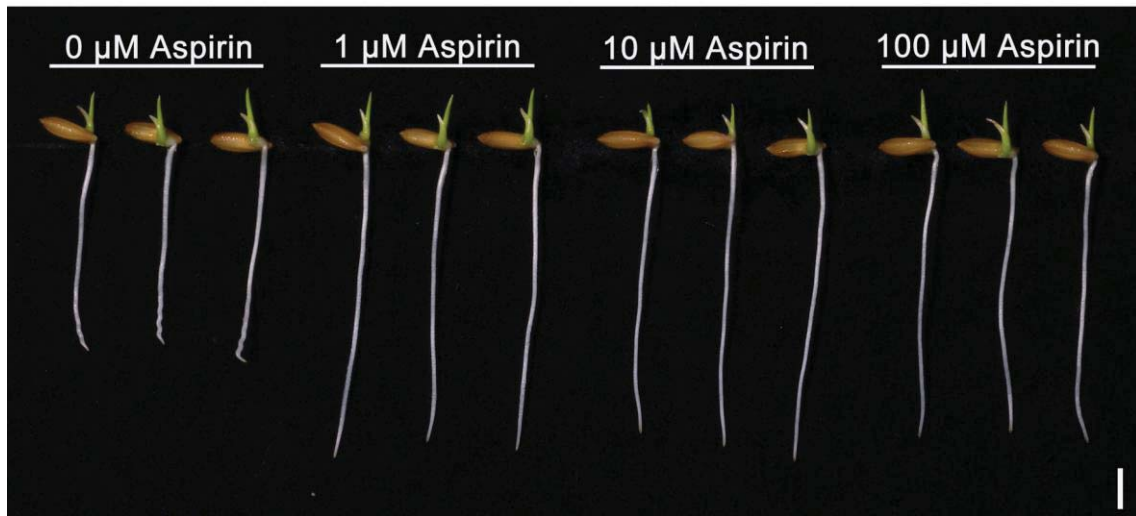


圖八、不同白光強度對台中在來 1 號(TCN1)水稻種子根之影響。

水稻種子於黑暗催芽 2 天後，分別處理不同白光強度為 30, 50, 100, 140, 180 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，且在白光處理 1-3 天(3-5 DAI)時進行照像觀察。每個處理之樣品數各為 30 顆水稻種子，最後取一樣品做為代表呈現結果。DAI= day after imbibition。比例尺=5 mm。

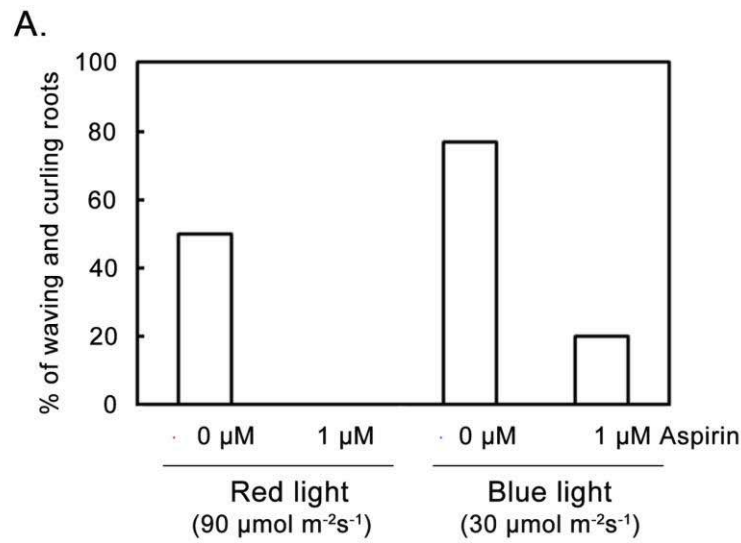


B.

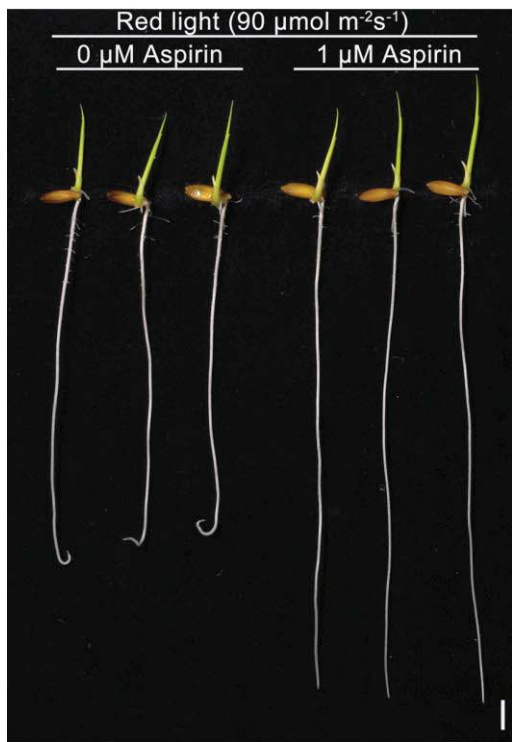


圖九、利用茉莉酸合成抑制劑之處理以觀察 TCN1 水稻種子根之波動形態。

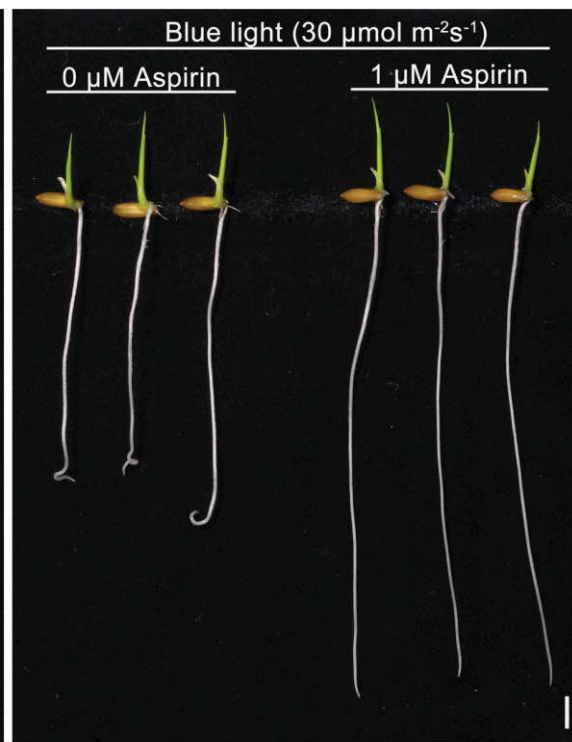
A. 水稻種子於白光處理 2 天(4 DAI)時，分別統計不同 Aspirin 濃度(0、1、10 及 100 μM)處理下，其種子根產生波動形態之百分比。結果為 3 重複之平均值，誤差值以 standard error (S.E.)表示。DAI= day after imbibition。B. TCN1 於不同 Aspirin 濃度處理兩天之幼苗形態。每個處理之樣品數各為 30 顆水稻種子，最後取三樣品做為代表呈現結果。比例尺=5 mm。



B.

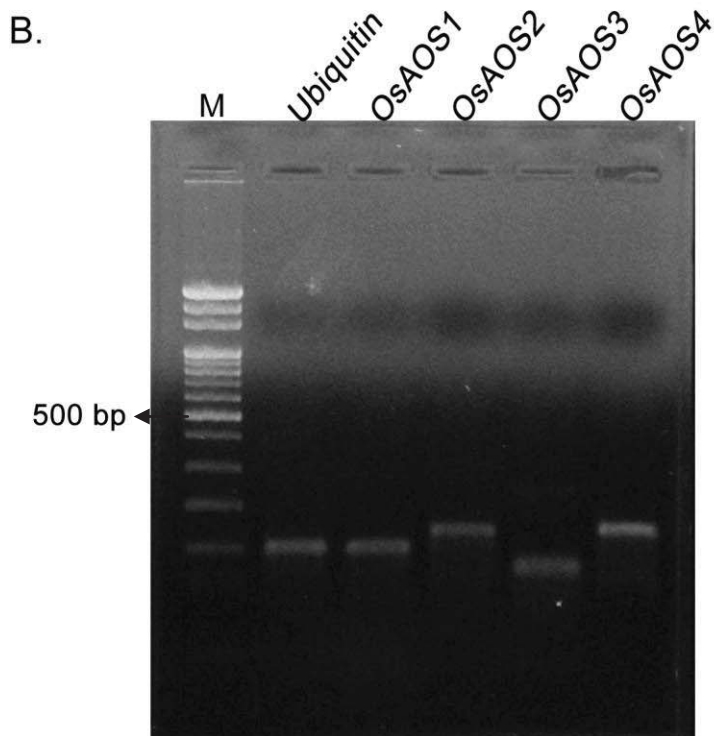
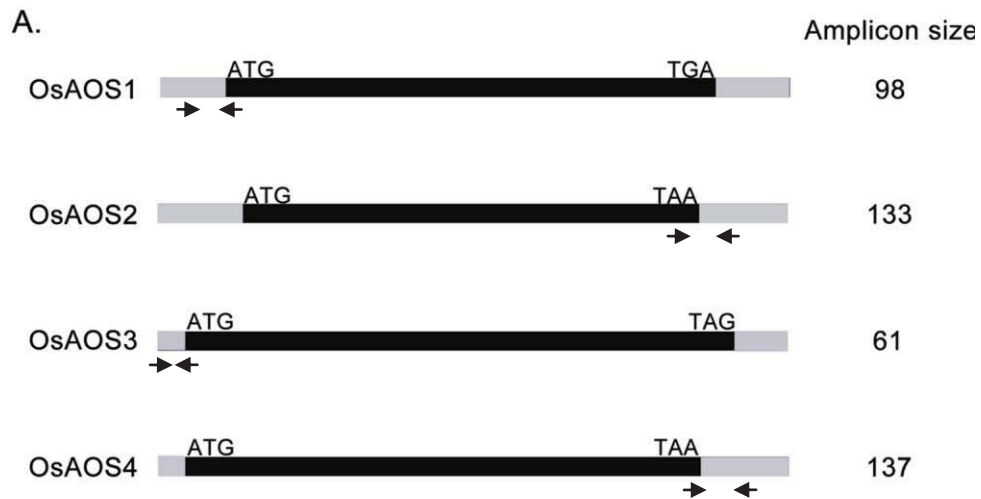


C.



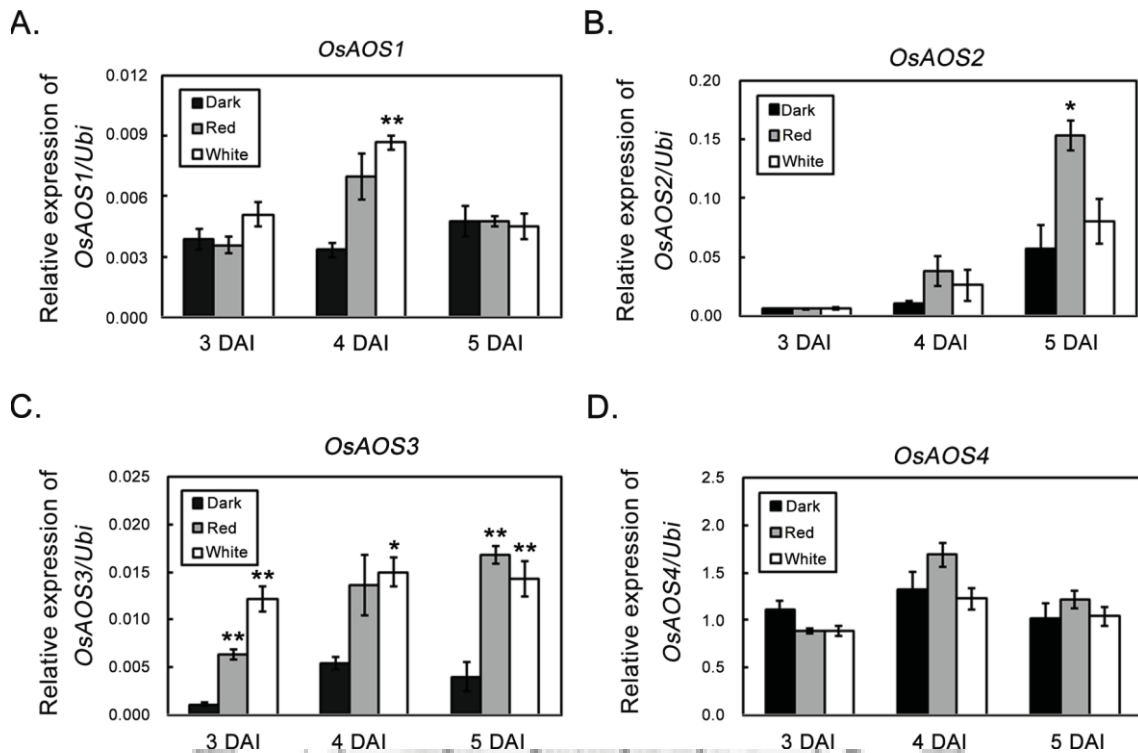
圖十、於紅光及低藍光下處理茉莉酸生合成抑制劑對波動狀根形成之影響。

A. 水稻種子於紅光($90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)及藍光($30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)處理 3 天(5 DAI)時，統計 1 μM Aspirin 處理下其種子根產生波動及捲曲形態之百分比，結果為 1 重複。DAI= day after imbibition。B. 以 1 μM Aspirin 及光照處理 3 天(5 DAI)之 TCN1 幼苗形態。每個處理之樣品數各為 30 顆水稻種子，最後取三樣品做為代表呈現結果。比例尺 =5 mm。



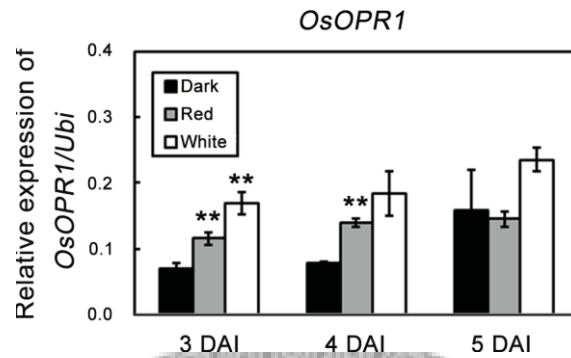
圖十一、利用 RT-PCR 選殖 *OsAOS* 家族基因之 cDNA 片段。

A. 為 *OsAOS* 家族基因之引子設計，箭頭表示 RT-PCR 引子設計之區域。B. 以白光處理 3 天(5 DAI)之 TCN1 水稻種子根的總 RNA 作為 RT-PCR 之模板，*Ubiquitin*、*OsAOS1*、2、3、4 及之片段長度分別為 101 bp、98 bp、133 bp、61 bp、137 bp。M 為 100 bp DNA ladder。



圖十二、TCN1 水稻種子根中 *OsAOS* 家族基因於不同光質處理下之表現。

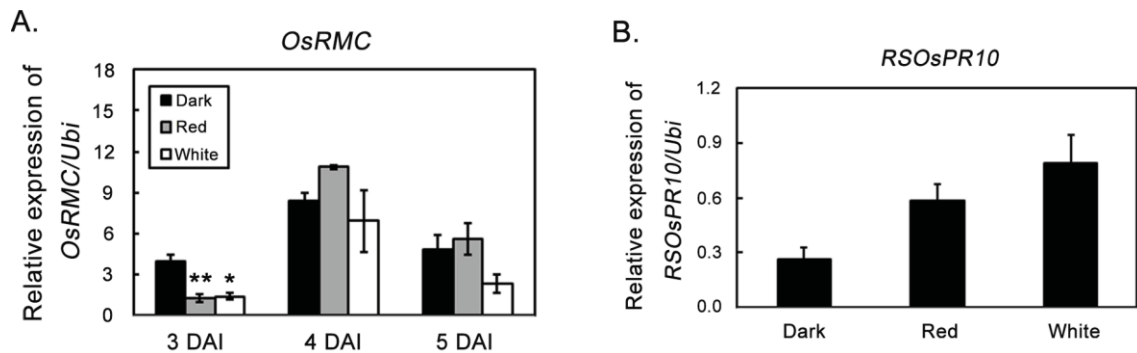
水稻種子黑暗催芽 2 天後進行不同光質處理 1-3 天(3-5 DAI)，並收取 TCN1 水稻種子根進行 *OsAOS* 基因表現之分析。A 為 *OsAOS1* 於不同光質處理之基因表現。B 為 *OsAOS2* 於不同光質處理之基因表現。C 為 *OsAOS3* 於不同光質處理之基因表現。D 為 *OsAOS4* 於不同光質處理之基因表現。結果為 3-4 重複之平均值，誤差值以 standard error (S.E.) 表示。DAI= day after imbibition。以 T-test 將不同光質處理與黑暗處理進行顯著性分析，*及**分別表示顯著相關 $p < 0.05$ 與 $p < 0.01$ 。



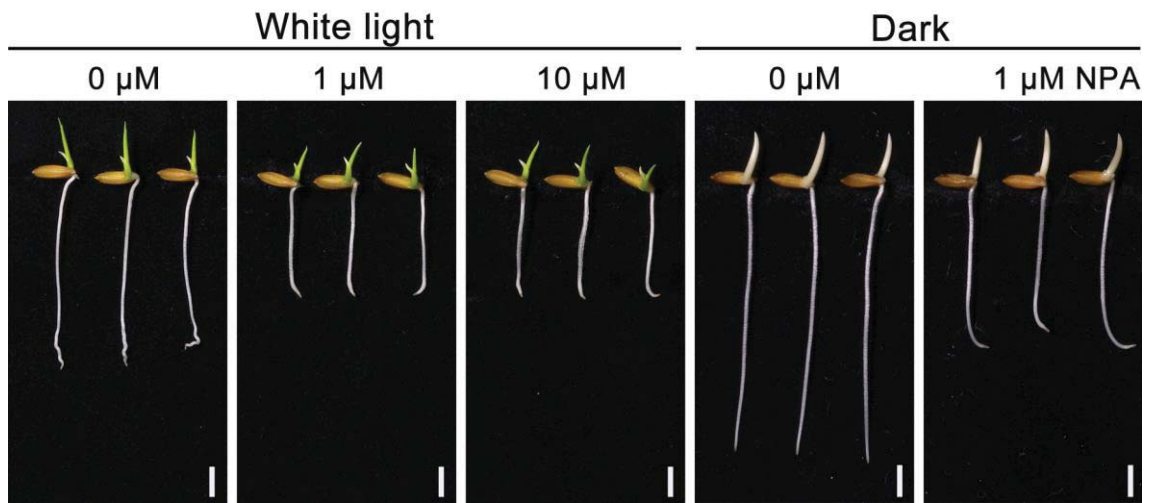
圖十三、TCN1 水稻種子根中 *OsOPR1* 基因於不同光質處理下之表現。

水稻種子在黑暗催芽 2 天後進行不同光質處理 1-3 天(3-5 DAI) ，並收取 TCN1 水稻種子根以分析 *OsOPR1* 基因之表現。結果為 3-4 重複之平均值，誤差值以 standard error (S.E.)表示。DAI= day after imbibition。以 T-test 將不同光質處理與黑暗處理進行顯著性分析，*及**分別表示顯著相關 $p < 0.05$ 與 $p < 0.01$ 。

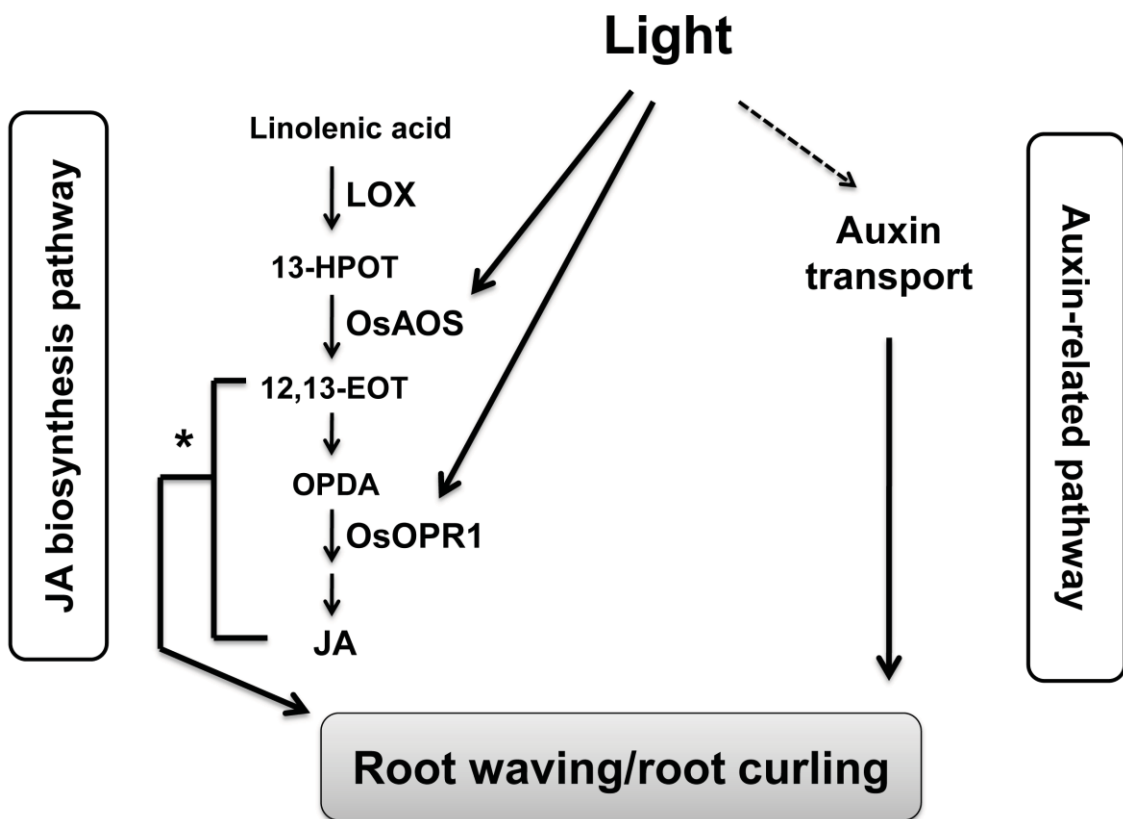




圖十四、TCN1 水稻種子根中 *OsRMC* 及 *RSOsPR10* 基因於不同光質處理下之表現。水稻種子 在黑暗催芽 2 天後進行不同光質處理，並收取 TCN1 水稻種子根以進行基因表現分析。A. 為 *OsRMC* 基因於不同光質處理 1-3 天(3-5 DAI)之表現結果。B. 為 *RSOsPR10* 基因於不同光質處理 2 天(4 DAI)之表現結果。結果為 3-4 重複之平均值，誤差值以 standard error (S.E.) 表示。DAI= day after imbibition。以 T-test 將不同光質處理與黑暗處理進行顯著性分析，*及**分別表示顯著相關 $p < 0.05$ 與 $p < 0.01$ 。



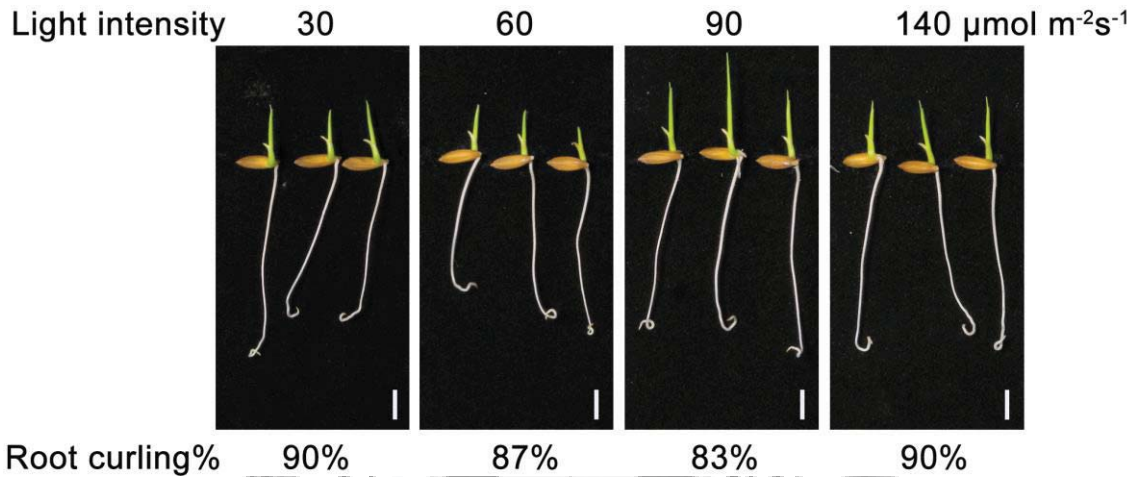
圖十五、生長素極性運移抑制劑對光照誘導 TCN1 水稻種子根波動形態之影響。水稻種子黑暗催芽 2 天且於白光($90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)處理 1 天(3 DAI)後，分別處理 0、1 及 10 μM NPA 一天，另外處理一組全黑暗作為實驗對照。每個處理之樣品數各為 30 顆水稻種子，最後取三樣品做為代表呈現結果。比例尺=5 mm。



圖十六、光照誘導水稻種子根產生波動形態之調控機制

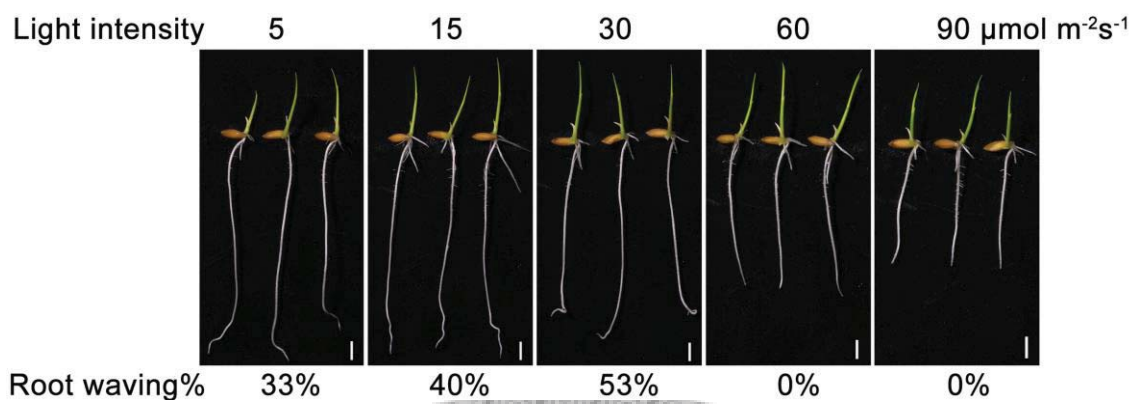
本研究結果指出光照會誘導 TCN1 水稻種子根中茉莉酸生合成之 *OsAOS* 家族基因及 *OsOPR1* 基因表現，且利用荷爾蒙抑制劑之處理證實茉莉酸生合成及生長素極向運移反應為光照誘導 TCN1 水稻種子根產生捲曲及波動形態所必須之條件。*代表茉莉酸生合成途徑之 *OsAOS* 下游訊息因子均可能會參與水稻種子根產生波動及捲曲形態之發生。

附錄



附圖一、不同紅光強度對 TCN1 水稻種子根之影響。

水稻種子於黑暗催芽 2 天後，將 TCN1 進行不同紅光光強度之處理(30, 60, 90 及 140 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)，於光照處理 3 天(5 DAI)時，進行照像觀察及統計不同紅光光強度之波動百分比。每個處理之樣品數各為 30 顆水稻種子，最後取三樣品做為代表呈現結果。比例尺=5 mm。(本實驗室康家豪，尚未發表的結果)



附圖二、不同藍光強度對 TCN1 水稻種子根之影響。

水稻種子於黑暗催芽 2 天後，將 TCN1 進行不同藍光光強度之處理(5, 15, 30, 60 及 90 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)，於光照處理 3 天(5 DAI)時，進行照像觀察及統計不同藍光光強度之波動百分比。每個處理之樣品數各為 30 顆水稻種子，最後取三樣品做為代表呈現結果。比例尺=5 mm。(本實驗為 1 重複的結果)

