

國立臺灣大學生物資源暨農學院農藝學系

碩士論文

Department of Agronomy

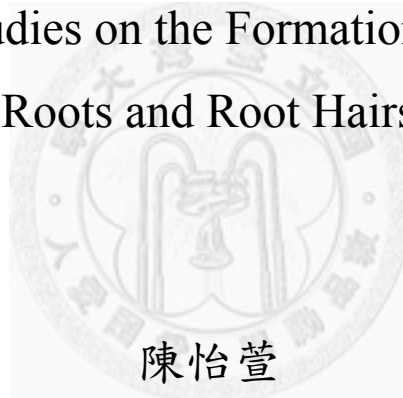
College of Bio-Resources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

水稻側根與根毛形成之研究

Studies on the Formation of  
Lateral Roots and Root Hairs in Rice



陳怡萱

Yi-Hsuan Chen

指導教授：高景輝 教授

Advisor: Ching Huei Kao, Professor

中華民國 100 年 7 月

July, 2011

## 誌謝

**“ I understand that the most important encounter in life is encounter with oneself. ”**

**Yves Saint Laurent**

口試當天早上，看到紀錄片《YSL 瘋狂的愛: L'amour Fou》中，Yves Saint Laurent 說：我了解到我這一生中最重要的經歷就是認識自己的過程。我一直覺得在台大的這六年裡面，學到的什麼專業知識都像雲一樣輕，可是我很努力在爬梳我自己，了解自己的價值，知道自己想要成為什麼樣的人。我常常說我是幸運的小孩，可能是世界上最幸運的小孩，在這個過程中，是許多人一起成就了現在的我。

最想感謝的人當然就是我的指導教授—高景輝老師，謝謝老師三年來對於論文的指導，實驗失敗的時候老師也總是鼓勵我們，最常掛在嘴上的話是：祝妳幸福，還要謝謝老師包容我緩慢的步調以及各式各樣奇怪的缺點，更重要的是在老師身上學到了很多人生的道理。

謝謝陳宗禮老師、王恆隆老師與奕婷學姊仔細地看了我的論文，給我許多不一樣的想法與觀點，更在百忙中抽空來當我的口試委員。謝謝洪傳揚老師，提供高科技設備，讓我的論文多了很多可愛的螢光照片，還有在我切片失敗的時候跟我分享你切片的作品，大大激勵了我想要跟你一樣成為切片高手的決心。

謝謝實驗室夥伴們。謝謝雲洋學長，你就像實驗室的領航員，有你在我們才不會在實驗的小細節裡迷路；謝謝庭邵學姊、士珏學姊與純馨學姊，在我剛進實驗室的時候帶我做實驗，告訴我許多實驗的小訣竅；謝謝張毅竹成為實驗室的壯丁，幫我們換燈管、抬重物，還有跟我一起畢業；謝謝雲雁與麥樞，總是幫助我一些小雜事。

謝謝我的小跟班們：董迪、小牛、小根跟糗哥，我說什麼妳們都會說好，跟妳們一起的時候雖然總是瘋瘋癲癲的很失控，不過是我最開心的時候，總是無憂無慮的，不管發生什麼事都有最幽默的解釋、有最樂觀的想法。

謝謝我的爸爸跟媽媽，雖然不懂我在做什麼，仍然為我感到驕傲，給我最強而有力毫無遲疑的支持，你們是我世界上最在意的人。謝謝妹妹，對我的要求總是使命必達，有時候反而比較像姊姊照顧我。

謝謝所有的你們，成就現在的我，讓我變成世界上最幸運的人。

## 中文摘要

本論文以水稻品種台中在來一號 (*Oryza sativa* L. cv. Taichung Native 1, TN1) 為材料，探討生長素與一氧化氮對黃化幼苗側根與根毛之形成是否需要  $\text{Ca}^{2+}$  與 heme oxygenase (HO) 之參與，以及 apocynin 對水稻黃化幼苗側根形成之影響。

Sodium nitroprusside (SNP，一氧化氮釋放劑)、indole-3-butyric acid (IBA，植物體中存在之生長素) 與 hemin (Hm，HO 之誘導劑) 處理皆會誘導水稻側根與根毛之形成。SNP 與 IBA 所誘導之一氧化氮形成以及側根與根毛形成可由一氧化氮清除劑 2-(4-carboxy-phenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (cPTIO) 所抑制，而 Hm 處理不影響一氧化氮之形成，且其對側根與根毛形成之作用也不受 cPTIO 影響，nitrate reductase (NR) 抑制劑 tungstate 會抑制 IBA 所誘導之一氧化氮形成以及側根與根毛之形成，顯示 IBA 是透過 NR 的作用產生一氧化氮進而影響側根與根毛之形成。 $\text{Ca}^{2+}$  之螯合物、通道阻礙劑、CaM 拮抗劑與  $\text{IP}_3$  合成抑制劑皆可明顯抑制 SNP 與 IBA 所誘導之側根與根毛形成，而不影響 SNP 與 IBA 所誘導之一氧化氮形成，顯示 SNP 與 IBA 之作用需要  $\text{Ca}^{2+}$  之參與，且  $\text{Ca}^{2+}$  位於一氧化氮與 IBA 作用之下游。

SNP、IBA 與 Hm 處理皆會使 HO 的活性提升，Zn protoporphyrin IX (ZnPPIX，HO 抑制劑) 與 hemoglobin (Hb，一氧化氮與一氧化鐵之清除劑) 皆能有效抑制 SNP、IBA 與 Hm 誘導之側根與根毛形成及 HO 的活性提升。而 HO 催化反應之產物 biliverdin IX $\alpha$  (BV) 也可有效地誘導側根與根毛形成，這些結果說明 SNP、IBA 與 Hm 所誘導之水稻黃化幼苗側根與根毛之形成需要透過 HO 的參與。

Apocynin 會誘導水稻側根形成與  $\text{H}_2\text{O}_2$  合成，而 diphenylene iodonium (DPI，NADPH oxidase 抑制劑) 可抑制其作用，顯示 apocynin 經由  $\text{H}_2\text{O}_2$  之作用調控側根形成。

**關鍵字：**生長素、一氧化氮、側根、根毛、水稻、鈣、HO、apocynin

## ABSTRACT

In this thesis, rice (*Oryza sativa* L. cv. Taichung Native 1, TN1, an Indica type) seedlings were used to investigate the involvement of  $\text{Ca}^{2+}$  and heme oxygenase (HO) in auxin- and nitric oxide (NO)-induced formation of lateral roots (LRs) and root hairs (RHs) and the effect of apocynin on LR formation.

Application of sodium nitroprusside (SNP; a NO donor), indole-3-butyric acid (IBA; a naturally occurring auxin), or hemin (Hm; a HO inducer) to rice seedlings induced the formation of LRs and RHs. LR and RH formation and NO production induced by SNP and IBA were prevented by the specific NO scavenger 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethyl-imidazoline-1-oxyl-3-oxide (cPTIO). Hm had no effect on NO production. Hm-induced formation of LRs and RHs could not be blocked by cPTIO. Nitrate reductase (NR) inhibitor sodium tungstate completely inhibited IBA-induced LR and RH formations and NO production. Clearly the effect of IBA is attributed by NO released, and the NO generation in response to IBA might mainly involve NR activity. The effects of  $\text{Ca}^{2+}$  chelators,  $\text{Ca}^{2+}$ -channel inhibitors, and calmodulin antagonists were effective in reducing the action of SNP and IBA. However,  $\text{Ca}^{2+}$  chelators and  $\text{Ca}^{2+}$ -channel inhibitors had no effect on SNP- and IBA-induced NO generation. It is concluded that  $\text{Ca}^{2+}$  is involved in SNP- and IBA-induced LR and RH formations, and is acting downstream of NO and IBA.

Treatment of rice seedlings with SNP, IBA, and Hm resulted in an enhancement of HO activity. Zn protoporphyrin IX (ZnPPIX; a HO inhibitor) and hemoglobin (Hb; a CO/NO scavenger) reduced the LR and RH formation and the enhancement of HO activity induced by SNP, IBA, and Hm. The product of HO catalyzed reaction, biliverdin IX $\alpha$  (BV), was also able to induce LR and RH formation and enhance HO activity. These data suggested that HO is involved in SNP-, IBA- and Hm-induced LR and RH formation.

Apocynin was able to induce LR formation and the generation of  $H_2O_2$ , which could be blocked by diphenylene iodonium (a NADPH oxidase inhibitor). These results indicate that the apocynin-induced LR formation is related to  $H_2O_2$ .

**Key words:** auxin, nitric oxide, lateral root, root hair, rice, calcium,  $HO$ , apocynin



# 目 錄

誌謝.....	i
中文摘要.....	ii
ABSTRACT.....	iii
目 錄.....	v
表目錄.....	vii
圖目錄.....	viii
縮寫字對照.....	x
前言.....	1
前人研究.....	3
水稻根系.....	3
生長素.....	4
一氧化氮.....	5
鈣離子.....	7
Heme oxygenase.....	7
Apocynin.....	9
本論文之研究方向.....	9
材料與方法.....	10
材料種植.....	10
處理.....	10
側根形成.....	11
根毛形成.....	11
一氧化氮螢光影像偵測.....	11
過氧化氫螢光影像偵測.....	12
HO 活性分析.....	12
根細胞活力測定.....	13
統計分析.....	13
結果.....	14
(一) SNP、IBA 與 Hm 對水稻黃化幼苗根之側根與根毛形成之影響.....	14
(二) SNP 與 IBA 誘導水稻黃化幼苗根側根與根毛之形成需要一氧化氮的參與，而 Hm 則不需要.....	21
(三) SNP 與 IBA 誘導水稻黃化幼苗根側根與根毛之形成與 $\text{Ca}^{2+}$ 之關係.....	29
(四) 一氧化氮清除劑、一氧化氮合成抑制劑、 $\text{Ca}^{2+}$ 螯合物、 $\text{Ca}^{2+}$ 通道阻礙劑、 $\text{IP}_3$ 合成抑制劑與 CaM 拮抗劑對根細胞活力之影響.....	33
(五) SNP、IBA 與 Hm 對 heme oxygenase 活性之影響.....	35

(六) ZnPPIX 與 hemoglobin 對 SNP、IBA 與 Hm 所誘導之水稻黃化幼苗側根與根毛之形成與 heme oxygenase 活性增加之影響.....	35
(七) Biliverdin IX $\alpha$ 對水稻黃化幼苗側根與根毛之形成與 heme oxygenase 活性之影響.....	35
(八) Apocynin 對水稻黃化幼苗側根形成之影響.....	47
(九) Apocynin 誘導水稻黃化幼苗側根之形成是經由 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 而非一氧化氮.....	47
討論.....	53
參考文獻.....	58



## 表目錄

表 1. 氯化鎘、一氧化氮清除劑、一氧化氮合成抑制劑、 $\text{Ca}^{2+}$ 螯合物、 $\text{Ca}^{2+}$ 通道阻礙劑、 $\text{IP}_3$ 合成抑制劑與 CaM 拮抗劑對水稻黃化幼苗根細胞活力之影響.....	34
---	----



## 圖目錄

圖 1. 不同濃度 SNP (a)、IBA (b)與 Hm (c)對水稻黃化幼苗側根形成之影響.....	15
圖 2. 不同濃度SNP對水稻黃化幼苗根毛形成之影響.....	16
圖 3. 不同濃度IBA對水稻黃化幼苗根毛形成之影響.....	17
圖 4. 不同濃度Hm對水稻黃化幼苗根毛形成之影響.....	18
圖 5. SNP、IBA與Hm對水稻黃化幼苗側根數量之影響.....	19
圖 6. SNP、IBA與Hm對水稻黃化幼苗根毛數量之影響.....	20
圖 7. cPTIO對SNP、IBA或Hm所誘導之水稻黃化幼苗側根形成之影響.....	22
圖 8. cPTIO對SNP、IBA或Hm所誘導之水稻黃化幼苗根毛形成之影響，與L-NAME及Tu對IBA 所誘導之水稻黃化幼苗根毛形成之影響.....	23
圖 9. cPTIO對SNP、IBA (a)或Hm (b)所誘導之水稻黃化幼苗側根數量之影響.....	24
圖 10. L-NAME與Tu對IBA所誘導之水稻黃化幼苗側根數量之影響.....	25
圖 11. cPTIO對SNP、IBA或Hm所誘導之水稻黃化幼苗中一氧化氮生成之影響，及L-NAME及 Tu對IBA所誘導之水稻黃化幼苗中一氧化氮生成之影響.....	26
圖 12. SNP與IBA所誘導之一氧化氮生成於水稻黃化幼苗種子根中之分布與側根形成部位之關 係.....	27
圖 13. SNP與IBA所誘導之一氧化氮生成於水稻黃化幼苗種子根中之分布與根毛形成部位之關 係.....	28
圖 14. $\text{Ca}^{2+}$ 螯合物、 $\text{Ca}^{2+}$ 通道阻礙劑、 $\text{IP}_3$ 與CaM拮抗劑對SNP及IBA所誘導之水稻黃化幼苗側 根數量之影響.....	30
圖 15. $\text{Ca}^{2+}$ 螯合物、 $\text{Ca}^{2+}$ 通道阻礙劑、 $\text{IP}_3$ 與CaM拮抗劑對SNP及IBA所誘導之水稻黃化幼苗根 毛形成之影響.....	31

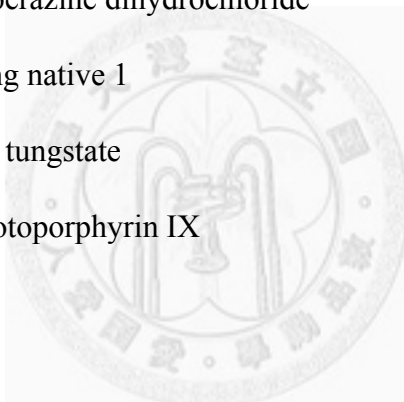
圖16. $\text{Ca}^{2+}$ 螯合物與 $\text{Ca}^{2+}$ 通道阻礙劑對SNP及IBA所誘導之水稻黃化幼苗一氧化氮合成之影響.....	32
圖17. Hm對HO活性之影響.....	36
圖18. SNP與IBA對HO活性之影響.....	37
圖19. ZnPPIX對SNP、IBA與Hm所誘導之水稻黃化幼苗根HO活性之影響.....	38
圖20. ZnPPIX對SNP、IBA與Hm所誘導之水稻黃化幼苗側根形成數量之影響.....	39
圖21. ZnPPIX對SNP、IBA與Hm所誘導之水稻黃化幼苗根毛形成之影響.....	40
圖22. Hb對SNP、IBA與Hm所誘導之水稻黃化幼苗根HO活性之影響.....	41
圖23. Hb對SNP、IBA與Hm所誘導之水稻黃化幼苗側根形成數量之影響.....	42
圖24. Hb對SNP、IBA與Hm所誘導之水稻黃化幼苗根毛形成之影響.....	43
圖25. BV對水稻黃化幼苗側根形成數量之影響.....	44
圖26. BV對水稻黃化幼苗根毛形成之影響.....	45
圖27. BV對HO活性之影響.....	46
圖28. 不同濃度apocynin對水稻黃化幼苗側根形成之影響.....	48
圖29. cPTIO與DPI對apocynin處理後水稻黃化幼苗中一氧化氮 (a)與 $\text{H}_2\text{O}_2$ (b)之影響.....	49
圖30. cPTIO與DPI對apocynin所誘導之水稻黃化幼苗側根數量之影響.....	50
圖31. 不同濃度 $\text{H}_2\text{O}_2$ 對水稻黃化幼苗側根形成之影響.....	51
圖32. Apocynin所誘導之 $\text{H}_2\text{O}_2$ 生成於水稻黃化幼苗種子根中之分布與側根形成部位之關係.....	52
圖33. 水稻幼苗根中生長素、一氧化氮與HO調控側根與根毛形成之機制.....	56
圖34. 水稻幼苗根中apocynin調控側根形成之機制.....	57

## 縮寫字對照

AsA	Ascorbic acid
BAPTA	1,2-bis( <i>o</i> -Aminophenoxy)ethane- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
BAPTA/AM	1,2-bis( <i>o</i> -Aminophenoxy)ethane- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid tetra(acetoxymethyl) ester
BSA	Bovine serum albumin
BV	Biliverdin IX $\alpha$
Ca <sup>2+</sup>	Calcium ion
CaM	Calmodulin
Cd	Cadmium
CDPK	Calcium-dependent protein kinase
CM-H <sub>2</sub> DCF DA	5-(and-6)-Chloromethyl-2',7'-dichlorodihydro-fluorescein diacetate
CO	Carbon monoxide
Cr	Chromium
Cu	Copper
cPTIO	2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide
CPZ	Chlorpromazine hydrochloride
DAF-FM DA	4-Amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate
DFO	Desferrioxamine
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DPI	Diphenylene iodonium
DTT	Dithiothreitol
DW	Dry weight

EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
Fd	Ferredoxin
FNR	Ferredoxin-NADP <sup>+</sup> reductase
FW	Fresh weight
GSH	Glutathione
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogen peroxide
Hb	Hemoglobin
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid
Hm	Hemin
HO	Heme oxygenase
IBA	Indole-2-butyric acid
IP <sub>3</sub>	Inositol triphosphate
KNO <sub>2</sub>	Potassium nitrate
K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	Potassium ferricyanide
L-NAME	<i>N</i> <sup>G</sup> -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride
LaCl <sub>3</sub>	Lanthanum (III) chloride
LiCl	Lithium chloride
LRs	Lateral roots
LSD	Least significant difference
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NEO	Neomycin sulfate
NO	Nitric oxide
NOS	Nitric oxide synthase

NR	Nitrate reductase
PVP	Polyvinylpyrrolidone
RHs	Root hairs
ROS	Reactive oxygen species
RR	Ruthenium red
SAS	Statistical analysis system
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SE	Standard error
SNP	Sodium nitroprusside
TFP	Trifluoperazine dihydrochloride
TN1	Taichung native 1
Tu	Sodium tungstate
ZnPPIX	Zinc protoporphyrin IX



## 前言

根是植物重要的營養器官之一，會分化出側根及根毛，負責幫助植物吸收水分和營養鹽，以及將植株固著於土壤當中，其形成與發育主要是受生長素以及環境的訊息所調控 (Casimiro *et al.*, 2001; Malamy and Ryan, 2001; Ridge and Katsumi, 2002; Malamy, 2005)。

一氧化氮 (nitric oxide, NO) 為氣態自由基分子，早期動物方面之研究顯示，一氧化氮是一個重要的訊息傳導分子。近年來對於植物體內一氧化氮的研究，使得一氧化氮在植物之生理反應所扮演的角色得到很大的重視。近來有一些文獻指出在植物細胞與器官的訊息傳導途徑中，生長素 (auxin) 和一氧化氮間有一定程度的關聯 (Correa-Aragunde *et al.*, 2004, 2006)。許多植物包括番茄、小黃瓜、萵苣、阿拉伯芥等的相關研究指出生長素經由一氧化氮影響植物不定根、側根以及根毛的形成 (Correa-Aragunde *et al.*, 2004; Lombardo *et al.*, 2006; Pagnussat *et al.*, 2002)。

Heme oxygenase (HO) 為生物體中重要的酵素之一，參與植物中許多生理反應，可催化heme的分解，產生一氧化碳 (carbon monoxide, CO) 與biliverdin IX $\alpha$  (BV)。也有文獻指出在番茄中，經由HO的作用，可以促進植物側根及根毛的形成 (Guo *et al.*, 2008)，並且在此過程中需要生長素與一氧化氮的參與，但是沒有人對水稻做過這方面的研究。本論文主要在探討生長素、一氧化氮與HO對於水稻黃化幼苗側根與根毛形成的影響。

鈣離子為生物中重要的二次訊息分子，當細胞接受環境或荷爾蒙的訊息之後，細胞質中之鈣離子濃度會提高，與攜鈣素 (calmodulin, CaM) 結合活化之，進而影響其他酵素之活性，使得細胞產生不同的生理反應。因此，鈣離子在水稻黃化幼

苗側根與根毛形成的過程中，是否扮演訊息分子的角色也是本論文想探討的主題之一。

Apocynin最初是由胡黃連 (*Picrorrhiza kurroa*)中萃取出之酚類化合物，常被用來當作NADP(H) oxidase的抑制劑 (Cai *et al.*, 2003)。在前人研究當中也發現apocynin可以誘導一氧化氮的產生 (Tossi *et al.*, 2009)，故我們進一步想確認在水稻黃化幼苗中，apocynin是否也可以因此誘導側根的形成。



## 前人研究

各個不同組織與器官之間訊息的流通對於多細胞生物來說是一個很重要的機制，因此細胞之間的訊息傳遞必須要快速且準確才可以確保多細胞生物生理機能的正常運作，而生物體藉由不同的系統、不同的機制去完成訊息傳導的過程。

植物與動物有非常不一樣的生活方式。植物是自營性生物，藉由行光合作用得到能量，並且固著於土壤當中，對於環境逆境必須要有一個良好的機制去對抗以維持生命。大多數的植物細胞對於環境的刺激都有很好的感應能力，可以進行一連串的反应使得整個植株可以對環境的刺激做出改變。而植物產生特殊的分子進行細胞間的訊息傳導，可能是使植物有這樣特性的一個原因。

### 水稻根系

根是植物一個重要的營養器官。根的周鞘細胞進行細胞分裂，穿越皮層與表皮細胞向外生長，出現在主根表面即形成側根 (Hao and Ishii, 1999)，而根的成熟部上之表皮細胞，會向外突出形成毛狀物，即為根毛。根上長出之側根及根毛，可幫助增加吸收水分與養分的表面積，並增加將植株固著於土壤當中的能力 (Wang *et al.*, 2006)。

水稻種子發芽時首先會長出種子根，並由種子根分化出側根及根毛，種子根的基部則會長出不定根。

側根與根毛的數量主要是受生長素以及環境的訊息所調控 (Casimiro *et al.*, 2001; Malamy and Ryan, 2001; Ridge and Katsumi, 2002; Malamy, 2005)。前人的研究指出，水分以及無機鹽 (例如：硝酸鹽與磷酸鹽) 的多寡，皆為影響側根與根毛發育的重要環境因子 (Robinson, 1994; Zhang and Forde, 1999; Forde and Lorenzo,

2001)。在小麥 (*Triticum aestivum*)與阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*)當中也發現重金屬鉻 (chromium, Cr)與銅 (copper, Cu)分別會影響其側根的發育 (Hasnain and Sabri, 1997; Pasternak *et al.*, 2005)。

## 生長素

植物荷爾蒙是一種有機物質，在低濃度下即可使植物產生特殊的生理、生化或是形態上之反應。生長素為研究歷史悠久的植物荷爾蒙之一，最早由 Darwin 在 1880 年於金絲雀穀草 (Canary grass, *Phalaris canariensis*)的向光性試驗中發現。

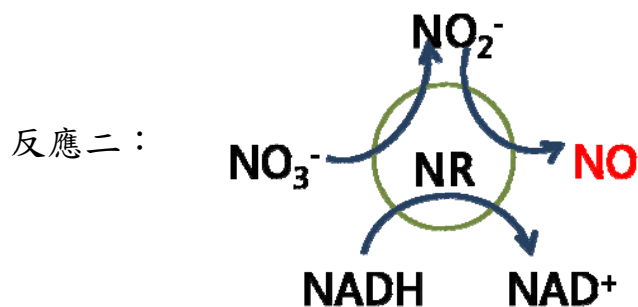
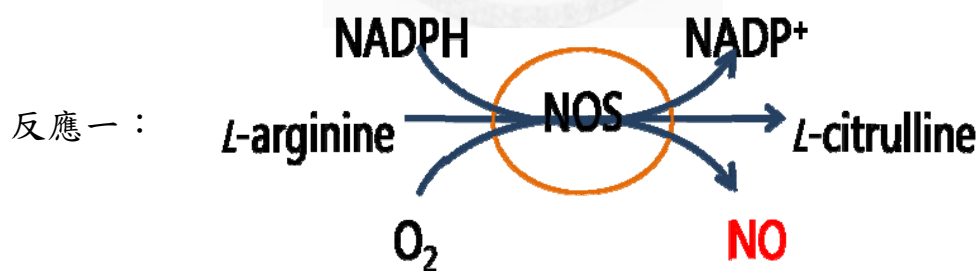
生長素已被證實可調控許多植物之生理反應。促進細胞生長與分裂 (Cosgrove, 1986; Rayle and Cleland, 1992)、促進木質部與韌皮部之分化 (Jacobs, 1952; Aloni, 1980; Aloni *et al.*, 2006)、延緩葉片老化、控制葉與果實之脫落 (Osborne, 1959; Leo and Sacher, 1970; Thomas and Stoddart, 1980)、影響果實生長 (Nitsch, 1953; Guardiola and Lázaro, 1987; Catalá *et al.*, 2000)以及與向地性和向光性 (Pickard and Thimann, 1964; Muday, 2001; Noh *et al.*, 2003)有關等等，其中與我們研究主題最相關的功能即為促進植物根的形成與發育。

外加生長素可以誘導側根的形成及發育 (Torrey, 1950; Blakely *et al.*, 1982; Muday and Haworth, 1994)，同時也可促進根毛的形成及增長 (Jackson *et al.*, 1960; Tanimoto *et al.*, 1995; Lombardo *et al.*, 2006; Takahashi and Inoue, 2008; Guo *et al.*, 2009)。在阿拉伯芥當中，抑制生長素由莖運移到根，可抑制其側根的發育 (Casimiro *et al.*, 2001; Bhalero *et al.*, 2002)。而對生長素不敏感的阿拉伯芥與水稻 (*Oryza sativa*)突變株，其側根的形成也會受到影響 (Casimiro *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2006)。同時，對生長素不敏感的突變株與生長素運移的突變株，*aux1*、*axr1*、*axr2* 及 *axr3*，其根毛的生長也受到抑制 (Lincoln *et al.*, 1990; Wilson *et al.*, 1990; Okada and Shimura, 1994; Leyser *et al.*, 1996)，而根毛形成功能缺失之阿拉伯芥突變株 *rhd6*，

也可藉由處理生長素回復其根毛的形成 (Masucci and Schiefelbein, 1994)。這些結果都說明植物側根與根毛之發育皆受生長素所調控。

## 一氧化氮

一氧化氮 (nitric oxide, NO) 是一個氣態自由基分子，早期對於一氧化氮的研究主要著重於動物方面，是一個重要的訊息傳導分子。近年來對於植物體內一氧化氮的研究，使得一氧化氮在植物之生理反應所扮演的角色得到很大的重視，例如：植物的生長分化 (Gouvêa *et al.*, 1997; Leshem *et al.*, 1998)、抗病 (Delledonne *et al.*, 1998; Durner *et al.*, 1998)、程序性細胞死亡 (programmed cell death, PCD) (Pedroso and Durzan, 2000; Pedroso *et al.*, 2000)、抵抗逆境 (Mackerness *et al.*, 2001; Mata and Lamattina, 2001)、種子萌芽、增加鐵的有效性以及氣孔的開關 (Lamattina *et al.*, 2003; Arasimowicz and Floryszak-Wieczorek, 2007; Besson-Bard *et al.*, 2009) 等等。



一氧化氮在植物當中有兩個合成系統，分別為酵素反應系統 (Wilson *et al.*, 2008)與非酵素反應系統。酵素反應系統：（一）一氧化氮合成酵素 (nitric oxide synthase, NOS)，經由一氧化氮合成酵素的作用將 *L*-arginine 和氧氣轉變為 *L*-citrulline 和一氧化氮 (反應一, Forstermann *et al.*, 1994)，並且植物與動物 NOS 的基因與蛋白質序列並不相同；（二）硝酸鹽還原酵素 (nitrate reductase, NR)，通常硝酸鹽還原酵素在細胞質當中將硝酸鹽還原為亞硝酸鹽，當亞硝酸鹽在細胞質中大量累積的時候，硝酸鹽還原酵素才可能將亞硝酸鹽還原為一氧化氮 (反應二, Bories and Bories, 1995)。非酵素還原系統：在酸性情況下 (pH<4)，有適當的還原劑存在，亞硝酸鹽可以轉變為一氧化氮，一般生理狀況下，一氧化氮不會經由這個途徑合成。

近年來之研究指出在植物細胞與器官的訊息傳導途徑中，生長素和一氧化氮有一定程度的關聯 (Pagnussat *et al.*, 2002, 2003; Correa-Aragunde *et al.*, 2004; Ötvös *et al.*, 2005; Correa-Aragunde *et al.*, 2006)。在許多植物當中發現一氧化氮可以促進不定根、側根或根毛的形成 (Creus *et al.*, 2005)，而生長素所引起的根的發育也發現是經由一氧化氮所調控 (Pagnussat *et al.*, 2002; Correa-Aragunde *et al.*, 2004; Lombardo *et al.*, 2006)。

生長素所誘導番茄 (*Solanum lycopersicum*)側根發育之訊息傳遞過程中，一氧化氮扮演著重要的角色 (Correa-Aragunde *et al.*, 2004, 2006; Guo *et al.*, 2008)。Lombardo 等人 (2006)最先在萵苣 (*Lactuca sativa*)以及阿拉伯芥當中，發現根毛形成的過程中一氧化氮是一個重要的分子，且在生長素誘導根毛形成的過程中，需要一氧化氮的參與。近來，Guo 等人 (2009)更證實，在番茄中，一氧化氮在生長素誘導根毛的形成途徑裡，為下游的訊息。

## 鈣離子

鈣為植物生長之必需元素，同時也是大量元素。植物細胞中之鈣離子的分布非常不均勻，主要儲存於液胞、胞器與細胞壁當中，鈣離子的濃度約為  $10^{-4}$  至  $10^{-3}$  M，而細胞質當中只有微量的鈣離子存在，濃度約為  $10^{-7}$  M。

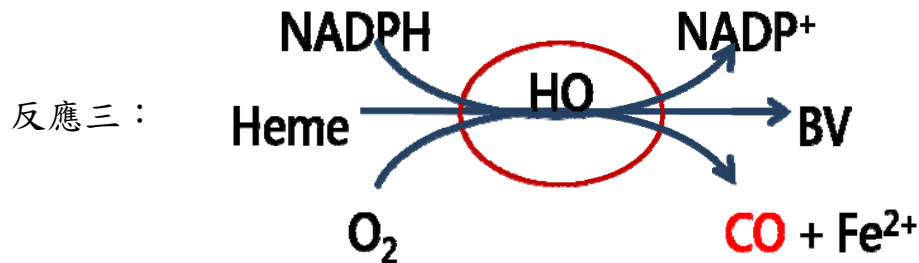
鈣離子可以做為二次訊息分子，當接受環境或荷爾蒙的訊息之後，細胞壁中的鈣離子會進入到細胞質當中，而液胞與胞器中之鈣離子也會釋放到細胞質中，使得細胞質中的鈣離子濃度提高後，鈣離子會直接與目標酵素結合影響細胞生理反應 (Felle, 1988; Gehring *et al.*, 1990a, 1990b; Knight *et al.*, 1991; Johannes *et al.*, 1992; Knight *et al.*, 1992; Shacklock *et al.*, 1992; Gilroy and Jones, 1993)，或是與攜鈣素 (Calmodulin, CaM) 結合，活化攜鈣素，使其影響其他酵素活性，如：protein kinases 與 phosphatases 等，催化一連串的反应，以調控細胞之生理 (Lee *et al.*, 1983; Hedrich *et al.*, 1990; Cosgrove and Hedrich, 1991; Ward and Schroeder, 1994; Bush, 1995)。

在動物中，一氧化氮為調控細胞中鈣離子恆定的重要訊息分子 (Willmott *et al.*, 1996; Clementi, 1998)。近年來植物的研究也指出，內生或外加的一氧化氮皆可影響細胞質中之鈣離子濃度，使得細胞質中鈣離子濃度增加 (Lamotte *et al.*, 2005; Besson-Bard *et al.*, 2008)。而 Lanteri 等人 (2006) 也提出，在小黃瓜 (*Cucumis sativus*) 中，生長素與一氧化氮誘導之不定根的形成過程中，需要透過鈣離子的參與。

## Heme oxygenase

Heme oxygenase (HO) 是一個在生物體中重要的酵素，在動物當中的研究已經非常多 (Otterbein *et al.*, 2003)，可以催化 heme 與一個分子的氧氣作用，產生一氧化碳 (carbon monoxide, CO)、二價鐵離子 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) 與 biliverdin IX $\alpha$  (BV) (反應三, Muramoto *et al.*, 2002; Terry *et al.*, 2002)。HOs 在動物當中有三個主要的形式，分別

為HO-1、HO-2與HO-3，HO-1為可誘導的形式，而HO-2與HO-3為持續表現之形式，通常表現量很低。



近來，在植物體中也發現HO-1之活性 (Terry *et al.*, 2002; Noriega *et al.*, 2004)，例如阿拉伯芥中之AtHO1 (HY1)可以分解heme，產生一氧化碳 (Muramoto *et al.*, 2002)，水稻中HY1之同源基因SE5也已經被發現 (Izawa *et al.*, 2000)。HO-1在植物體中參與許多重要的生理反應，包括調控phytochrome chromophore的合成 (Davis *et al.*, 1999; Muramoto *et al.*, 1999; Davis *et al.*, 2001)、抵抗氧化逆境 (Noriega *et al.*, 2004)、影響根部的發育 (Xuan *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2009)等。

動物的研究中發現熱休克 (heat shock)、金屬、脂多醣 (lipopolysaccharide)、缺氧、與活化氧族 (reactive oxygen species, ROS)等皆會誘導 HO 的活性上升 (Piantadosi, 2002)。而在植物中也發現ultraviolet-B、過氧化氫 (hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Yannarelli *et al.*, 2006)、sodium nitroprusside (SNP) (Noriega *et al.*, 2007)與鎘 (cadmium, Cd)皆會使得 *HO-1* 之表現量提升。

近來的研究指出HO之產物一氧化碳可以調節植物根部的發育 (Zimmerman *et al.*, 1933; Xu *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2008, 2009; Xuan *et al.*, 2008)，在番茄與油菜 (*Brassica napus*)中，一氧化碳誘導之側根與根毛形成需要透過生長素和一氧化氮的作用 (Cao *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2008, 2009)。然而也有文獻指出，

HO作用產生之一氧化碳，參與在生長素所誘導之小黃瓜的不定根形成過程中 (Xuan *et al.*, 2008)。

## Apocynin

Apocynin 最初是由胡黃連 (*Picrorrhiza kurroa*)中萃取出來的酚類化合物，胡黃連為多年生草本植物，主要產於西藏、雲南等地，常被用來當作中藥材使用，可以治療慢性發炎 (Meyer and Schmitt, 2000)。

Apocynin 功能的研究著重於動物方面，apocynin 常被用來當作 NADP(H) oxidase 的抑制劑 (Cai *et al.*, 2003)，減少超氧自由基 (superoxide)的形成，以減緩吞噬細胞 (phagocytes)中的氧化逆境 (Vejrazka *et al.*, 2005)。然而，也有研究指出在神經膠細胞 (glial cells)中，apocynin 會藉由降低還原態 glutathione (GSH)與氧化態 glutathione (GSSG)含量之比例，導致脂質過氧化作用提升，並使得過氧化氫的濃度提高，進而造成氧化逆境 (Riganti *et al.*, 2006)。Riganti 等人 (2008)發現在氧化逆境下，apocynin 處理會誘導神經膠細胞中一氧化氮的生成。而關於 apocynin 對植物影響之研究還非常少，apocynin 可以誘導玉米 (*Zea mays*)葉片一氧化氮的生成，使得玉米植株可以抵抗非生物性的氧化逆境 (Tossi *et al.*, 2009)

## 本論文之研究方向

本論文主要探討水稻黃化幼苗側根與根毛形成過程中，生長素、一氧化氮與 HO 的作用，以及鈣離子所扮演的角色，並進一步探討生長素、一氧化氮與 HO 之間的關係；同時也探討 apocynin 對水稻黃化幼苗側根形成之影響。

## 材料方法

### 材料種植

本論文以秈稻 (indica-type) 台中在來一號 (*Oryza sativa* L. cv. Taichung Native 1) 的種子做為材料，用 3% sodium hypochlorite 消毒十五分鐘後，以清水洗淨數次，平鋪於墊有濾紙 (直徑二十公分) 的培養皿當中，加入蒸餾水保持濕潤，置於 37°C 黑暗的生長箱中催芽二十四小時，後挑選露白均一之種子移到 27°C 黑暗的生長箱中生長兩天。

### 處理

以兩天大生長情況一致的水稻黃化幼苗進行處理，取五株黃化幼苗置於鋪有濾紙 (直徑九公分) 含有十毫升處理液 [蒸餾水、sodium nitroprusside (SNP)、indole-2-butyric acid (IBA)、hemin (Hm)、biliverdin IX $\alpha$  (BV)、apocynin、hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、100  $\mu$ M 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (cPTIO)、1 mM sodium tungstate (Tu)、1 mM *N*<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME)、0.14 g L<sup>-1</sup> hemoglobin (Hb)、1  $\mu$ M diphenylene iodonium (DPI)、200  $\mu$ M potassium nitrite (KNO<sub>2</sub>) 或 200  $\mu$ M potassium ferricyanide (K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>)] 的培養皿中，一個培養皿為一重複，每個處理四重複，放至 27°C 黑暗的生長箱中，分別於各試驗所需的處理時間後，收取黃化幼苗進行分析。

而 HO 抑制劑與鈣離子螯合物、鈣離子通道阻礙劑及 calmodulin 拮抗劑則必須進行前處理。同樣選取兩天大生長情況一致的水稻黃化幼苗，置於鋪有濾紙 (直徑九公分) 含有十毫升處理液 [蒸餾水、200  $\mu$ M zinc protoporphyrin IX (ZnPPIX)、100  $\mu$ M ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA)、100  $\mu$ M 1,2-bis(*o*-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (BAPTA)、100  $\mu$ M

1,2-bis(*o*-Aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid tetra(acetoxymethyl) ester (BAPTA/AM)、500  $\mu$ M lanthanum chloride ( $\text{LaCl}_3$ )、50  $\mu$ M ruthenium red (RR)、100  $\mu$ M verapamil、50  $\mu$ M neomycin sulfate (NEO)、5 mM lithium chloride (LiCl)、100  $\mu$ M chlorpromazine hydrochloride (CPZ)或 100  $\mu$ M trifluoperazine dihydrochloride (TFP)] 的培養皿中，放在 27°C 黑暗的生長箱中前處理三個小時後，再將黃化幼苗移至分別含有蒸餾水、500  $\mu$ M SNP、1  $\mu$ M IBA 或 10  $\mu$ M Hm 的培養皿中進行處理，放至 27°C 黑暗的生長箱中，分別於各試驗所需的處理時間後，收取黃化幼苗進行分析。

## 側根形成

水稻黃化幼苗處理三天之後，觀察其種子根上側根形成之狀況，計算一公釐以上之側根數量並且拍照。

## 根毛形成

水稻黃化幼苗處理二十四小時之後，取距離種子基部一公分到兩公分之間之種子根，以切片機 (D.S.K Microslicer DTK-1000)將其縱切，厚度為 40 micron，以螢光顯微鏡 (Nikon ECLIPSE 50i)觀察根毛之數量，並計算。有些試驗，則於處理三天後，以電子解剖顯微鏡 (Nikon SMZ1500)觀察種子根上根毛之形成狀況，並且拍照。

## 一氧化氮螢光影像偵測

一氧化氮螢光之測定主要根據 Xiong 等人 (2009)之方法修改而成。處理後之水稻黃化幼苗，切下種子根，將其完整浸在 20  $\mu$ M 之一氧化氮螢光探針 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate [DAF-FM DA，溶於 dimethyl sulfoxide (DMSO, 0.0025% (v/v))，以 20 mM HEPES buffer (pH 7.5)稀釋之] 中，遮光靜置於室溫下十五分鐘，再浸泡在 20 mM HEPES buffer (pH 7.5，新鮮配

置)中十五分鐘，以去除種子根表面之螢光探針，即可以螢光電子解剖顯微鏡 (Nikon SMZ1500)觀察其根尖之一氧化氮螢光 (激發波長與發散波長分別為 495 nm 與 515 nm)。取距離種子根基部約一公分之根的片段，以切片機 (D.S.K Microslicer DTK-1000)將其縱切或橫切，厚度皆為 40 micron，以螢光顯微鏡 (Nikon ECLIPSE 50i)觀察種子根切面上之一氧化氮螢光分布情形 (激發波長與發散波長分別為 495 nm 與 515 nm)。縱切之切片主要觀察一氧化氮螢光分布與側根形成的關係，而橫切之切片則主要觀察一氧化氮螢光分布與根毛形成的關係。

### 過氧化氫螢光影像偵測

過氧化氫螢光之測定主要根據 Shin 與 Schachtman (2004)之方法。處理後之水稻黃化幼苗，切下種子根，將其完整浸在 50  $\mu$ M 之過氧化氫螢光探針 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydro-fluorescein diacetate [CM-H<sub>2</sub>DCF DA，溶於 dimethyl sulfoxide (DMSO, 0.0025% (v/v))]中，靜置於 37°C 生長箱中三十分鐘，再以蒸餾水清洗種子根數次，以去除表面之螢光探針，即可以螢光電子解剖顯微鏡 (Nikon SMZ1500)觀察其過氧化氫螢光 (激發波長與發散波長分別為 495 nm 與 515 nm)。取距離種子根基部約一公分之根的片段，以切片機 (D.S.K Microslicer DTK-1000)將其縱切，厚度為 40 micron，以螢光顯微鏡 (Nikon ECLIPSE 50i)觀察種子根切面上之過氧化氫螢光分布情形與側根形成的關係(激發波長與發散波長分別為 495 nm 與 515 nm)。

### HO 活性分析

Heme oxygenase (HO)活性分析主要根據 Liu 等人 (2007)之方法修改而成。取二十五條水稻黃化幼苗的根，加入新鮮配置的 3 mL HEPES-Tris [25 mM (pH 7.4)，內含 250 mM mannitol、1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、1% (w/v) polyvinylpyrrolidone (PVP)、10% (v/v) glycerol 及 1 mM dithiothreitol (DTT)]，在冰

浴中研磨至均質後，以 15000 g 於 4°C 下離心三十分鐘。取 250  $\mu$ L 上清液，加入 2 mM desferrioxamine (DFO, 以 100 mM HEPES-NaOH (pH 7.2) 稀釋之)、10  $\mu$ M Hm、0.15 mg mL<sup>-1</sup> bovine serum albumin (BSA)、50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> (4.2  $\mu$ M) spinach ferredoxin (Fd)、0.025 units mL<sup>-1</sup> spinach ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase (FNR)、5 mM ascorbic acid (AsA)，最後加入 100  $\mu$ M NADPH (新鮮配置) 開始反應，總反應體積為 1 mL，置於 37°C 下三十分鐘。以分光光度計測量波長 650 nm 的吸光值，並以消光係數 6.25 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> 估算 BV 的濃度，每單位 (unit) HO 活性定義為每三十分鐘生成 1  $\mu$ mol BV 所需的酵素量。由於根中蛋白質含量很低，因此 HO 活性以乾重為基準來表示，HO 活性 (units g<sup>-1</sup> DW) 為  $A_{650} \div 6.25$  (消光係數，mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)  $\times$  1 (反應體積)  $\times$  12 (稀釋倍率)  $\div$  乾重 (g)。

## 根細胞活力測定

為試驗本論文中所使用之抑制劑是否會影響根細胞活力，我們於抑制劑處理根後三小時，以 Evans blue 處理測定其細胞活力，測定方法主要根據 Baker 與 Mock (1994) 之方法修改而成。將水稻黃化幼苗浸於 Evans blue (0.25%, w/v) 中十五分鐘，再移到蒸餾水中浸泡十五分鐘兩次，以進行退染，而後在室溫下靜置於蒸餾水中隔夜。取十條幼苗的根，切取根尖 2 cm 的部分，加入 3 mL 1% (w/v) sodium dodecyl sulphate [SDS, 溶於 50% (v/v) methanol 中] 研磨至均勻，放至 50°C 水浴加熱一個小時後，在室溫下以 13000 g 離心十分鐘，取上清液以分光光度計測量波長 595 nm 的吸光值，即可代表細胞之活力，吸光值愈高則表示細胞活力越低。

## 統計分析

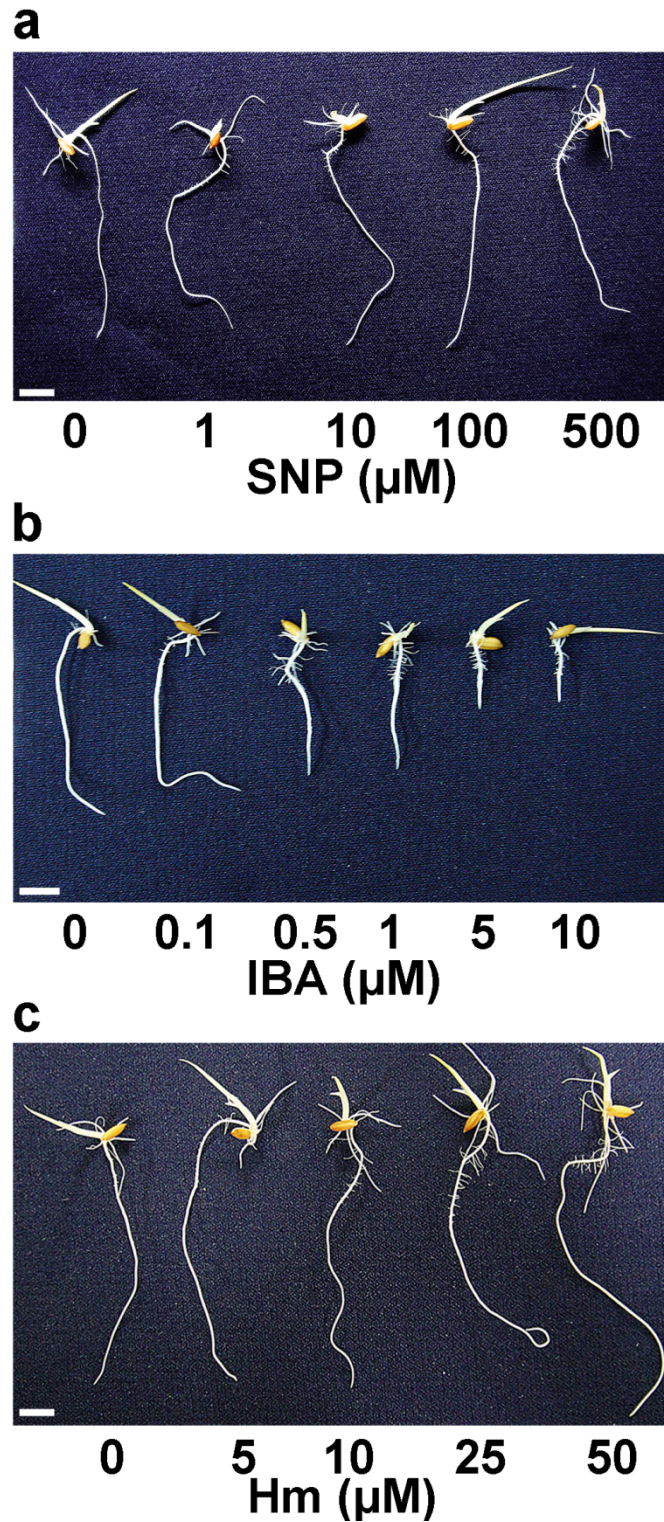
本論文每一個試驗處理皆為四重複，結果以平均值加上標準差 (standard error, SE) 表示。統計分析則以 SAS (statistical analysis system) 9.0 版本進行，採 Duncan's multiple range test，比較不同處理之間之差異， $P < 0.05$  則視為處理間有顯著差異。

## 結果

### (一) SNP、IBA 與 Hm 對水稻黃化幼苗根之側根與根毛形成之影響

以不同濃度之 SNP、IBA 或 Hm 處理在黑暗下生長兩天之水稻黃化幼苗，三天後分別觀察其種子根上側根與根毛形成之情形，試驗結果顯示 SNP (1-500  $\mu$ M)、IBA (0.1-10  $\mu$ M)與 Hm (5-50  $\mu$ M)皆可誘導水稻黃化幼苗側根 (圖 1)與根毛 (圖 2、3、4)之形成。SNP、IBA 與 Hm 分別於處理濃度為 500、1 與 10  $\mu$ M 時，誘導側根與根毛形成效果最佳，故後續之試驗即以此為處理濃度。

進一步量化 SNP、IBA 或 Hm 對水稻黃化幼苗側根與根毛形成之影響，分別以 500  $\mu$ M SNP、1  $\mu$ M IBA 或 10  $\mu$ M Hm 處理兩天大之水稻黃化幼苗，在處理後一、二、三天計算側根形成之數量，及在處理一天後計算根毛形成之數量。試驗結果顯示 SNP、IBA 或 Hm 處理三天後之水稻黃化幼苗，其側根之形成數量有顯著的提升 (圖 5)，而處理一天即可觀察到根毛數量皆明顯比水處理多 (圖 6)，圖 6a 也顯示 SNP、IBA 或 Hm 處理可增加根毛之長度。



**圖 1.** 不同濃度 SNP (a)、IBA (b)與 Hm (c)對水稻黃化幼苗側根形成之影響。以黑暗下生長兩天之水稻黃化幼苗為材料，處理不同濃度之 SNP (1、10、100、500  $\mu\text{M}$ )、IBA (0.1、0.5、1、5、10  $\mu\text{M}$ )或 Hm (5、10、25、50  $\mu\text{M}$ )，三天後進行觀察並拍照。每試驗處理四重複。Bar= 1 cm。

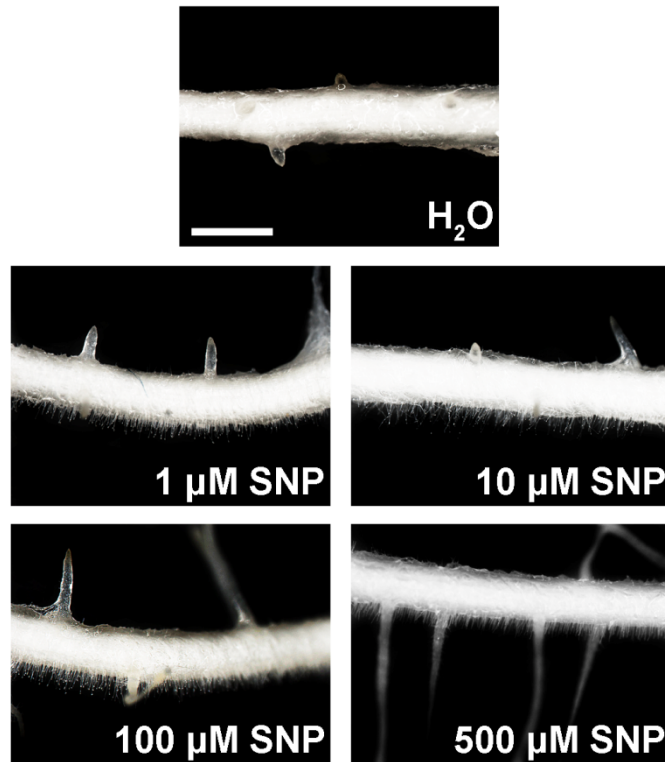
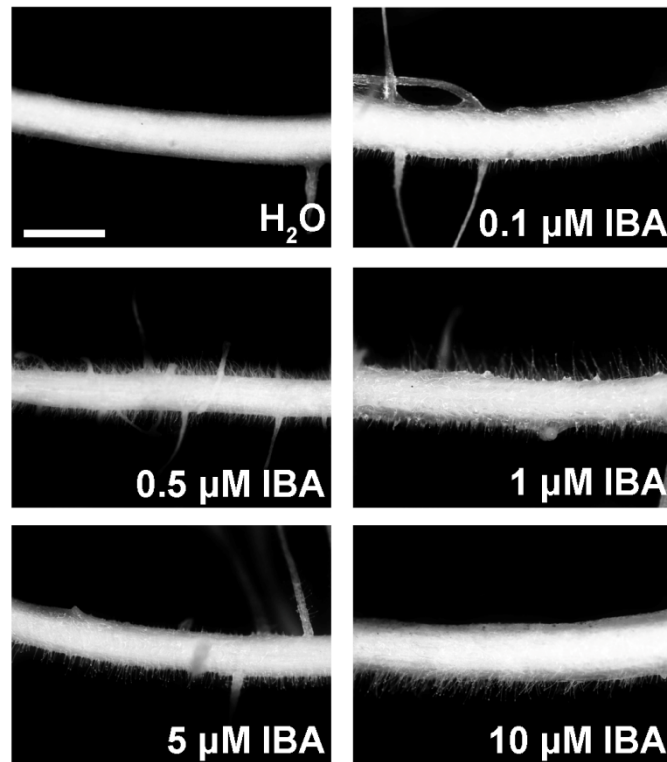


圖 2. 不同濃度 SNP 對水稻黃化幼苗根毛形成之影響。以黑暗下生長兩天之水稻黃化幼苗為材料，處理不同濃度之 SNP (1、10、100、500  $\mu$ M)，三天後進行觀察，並取距種子根基部約一公分之根進行拍照。每試驗處理四重複。Bar= 1 mm。



**圖 3.** 不同濃度 IBA 對水稻黃化幼苗根毛形成之影響。以黑暗下生長兩天之水稻黃化幼苗為材料，處理不同濃度之 IBA (0.5、1、5、10  $\mu$ M)，三天後進行觀察，並取距種子根基部約一公分之根進行拍照。每試驗處理四重複。*Bar*= 1 mm。

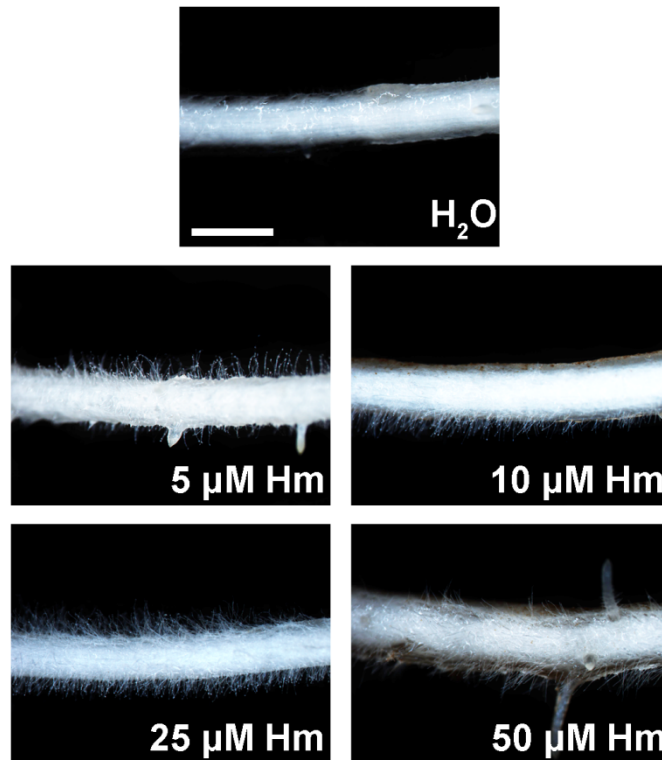


圖 4. 不同濃度 Hm 對水稻黃化幼苗根毛形成之影響。以黑暗下生長兩天之水稻黃化幼苗為材料，處理不同濃度之 Hm (5、10、25、50  $\mu$ M)，三天後進行觀察，並取距種子根基部約一公分之根進行拍照。每試驗處理四重複。Bar= 1 mm。

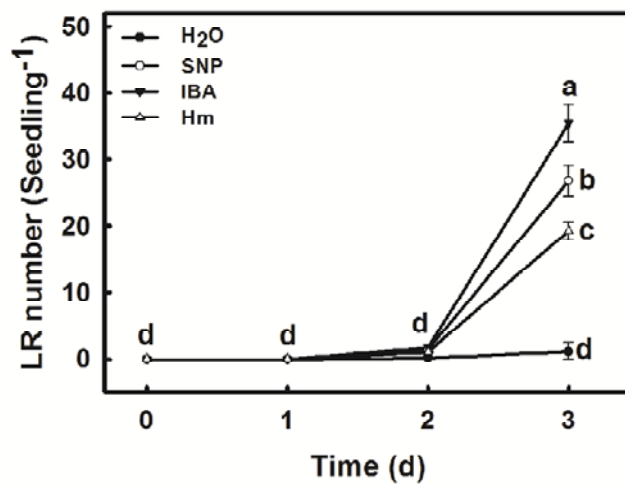


圖 5. SNP、IBA 與 Hm 對水稻黃化幼苗側根數量之影響。以黑暗下生長兩天之水稻黃化幼苗為材料，分別處理水、500  $\mu$ M SNP、1  $\mu$ M IBA 或 10  $\mu$ M Hm，於處理後一、二、三天計算其種子根上之側根數量。每試驗處理四重複，垂直線距表示標準差，相同字母表示處理間無顯著差異 ( $P < 0.05$ )。



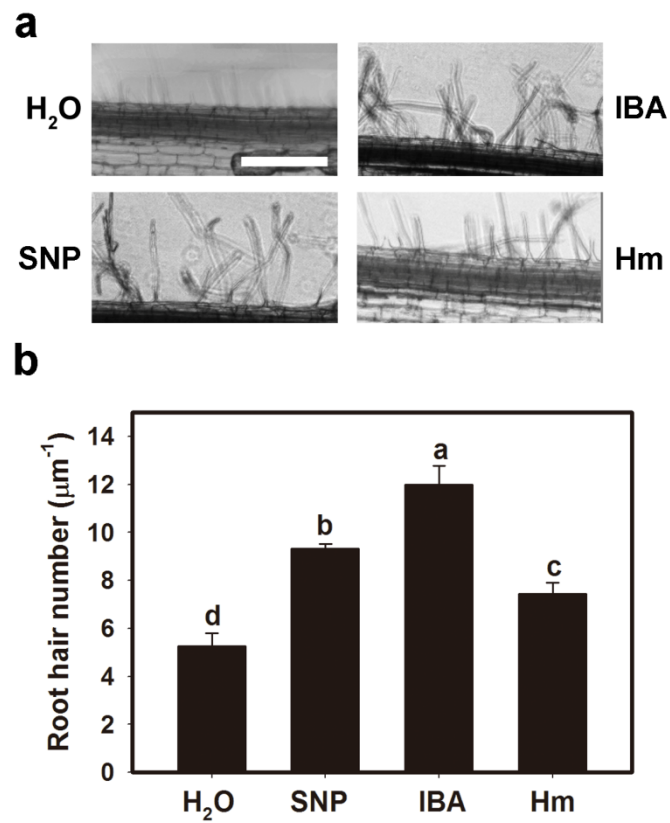


圖 6. SNP、IBA 與 Hm 對水稻黃化幼苗根毛數量之影響。以黑暗下生長兩天之水稻黃化幼苗為材料，分別處理水、500  $\mu\text{M}$  SNP、1  $\mu\text{M}$  IBA 或 10  $\mu\text{M}$  Hm，24 小時後進行切片後拍照 (a)，計算根毛數量 (b)。每試驗處理四重複，垂直線距表示標準差，相同字母表示處理間無顯著差異 ( $P < 0.05$ )。Bar = 1  $\mu\text{m}$ 。

## (二) SNP 與 IBA 誘導水稻黃化幼苗側根與根毛之形成需要一氧化氮的參與，而 Hm 則不需要

為了瞭解 SNP、IBA 與 Hm 誘導水稻黃化幼苗側根及根毛之形成是否是經由一氧化氮的作用，水稻黃化幼苗以一氧化氮之清除劑 cPTIO (100  $\mu$ M) 與 SNP、IBA 或 Hm 共同處理三天。試驗結果顯示 SNP 與 IBA 所誘導之側根 (圖 7、圖 9a) 與根毛 (圖 8) 的形成皆因為 cPTIO 處理受到明顯的抑制，說明 SNP 與 IBA 的作用是由一氧化氮所引起，而 Hm 所誘導之側根 (圖 7、圖 9b) 與根毛 (圖 8) 的形成則不受 cPTIO 處理所抑制。由於 SNP 分子結構的關係，處理 SNP 後同時會釋放出一氧化氮、nitrate 與 ferricyanide，為了進一步確認 SNP 誘導水稻黃化幼苗側根及根毛之形成是經由一氧化氮的作用而非 nitrate 與 ferricyanide，將水稻黃化幼苗以 100  $\mu$ M KNO<sub>2</sub> 與 100  $\mu$ M K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 處理，結果顯示 KNO<sub>2</sub> 與 K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 並不能誘導側根 (圖 7) 與根毛 (圖 8) 之形成。本論文也以螢光探針 DAF-FM DA 偵測水稻黃化幼苗根中之一氧化氮。如圖 11 所示，Hm、KNO<sub>2</sub> 與 K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 並不能誘導一氧化氮之生成 (圖 11a)，而 SNP (圖 11a) 與 IBA (圖 11b) 則明顯的誘導之，且受 cPTIO 處理而抑制 (圖 11)。

為了瞭解 IBA 誘導水稻黃化幼苗側根及根毛之形成與一氧化氮合成間之關係，以 NOS 抑制劑 L-NAME (1 mM) 與 NR 抑制劑 Tu (1 mM) 與 IBA 共同處理三天。結果顯示 NR 抑制劑 Tu 可以完全抑制 IBA 所誘導之側根 (圖 7、圖 10)、根毛 (圖 8) 的形成與一氧化氮之螢光 (圖 11b)，而 NOS 抑制劑 L-NAME 則沒有抑制的作用 (圖 7、圖 8、圖 10、圖 11b)。為更進一步確認 IBA 與 SNP 誘導之一氧化氮生成與側根及根毛形成之關係，水稻黃化幼苗以 SNP 與 IBA 處理後 24 小時及 42 小時，分別取種子根以螢光探針 DAF-FM DA 處理後進行縱切及橫切，發現一氧化氮之螢光分布於側根根原基 (圖 12) 與根的表皮 (圖 13)，即為側根與根毛形成之部位。

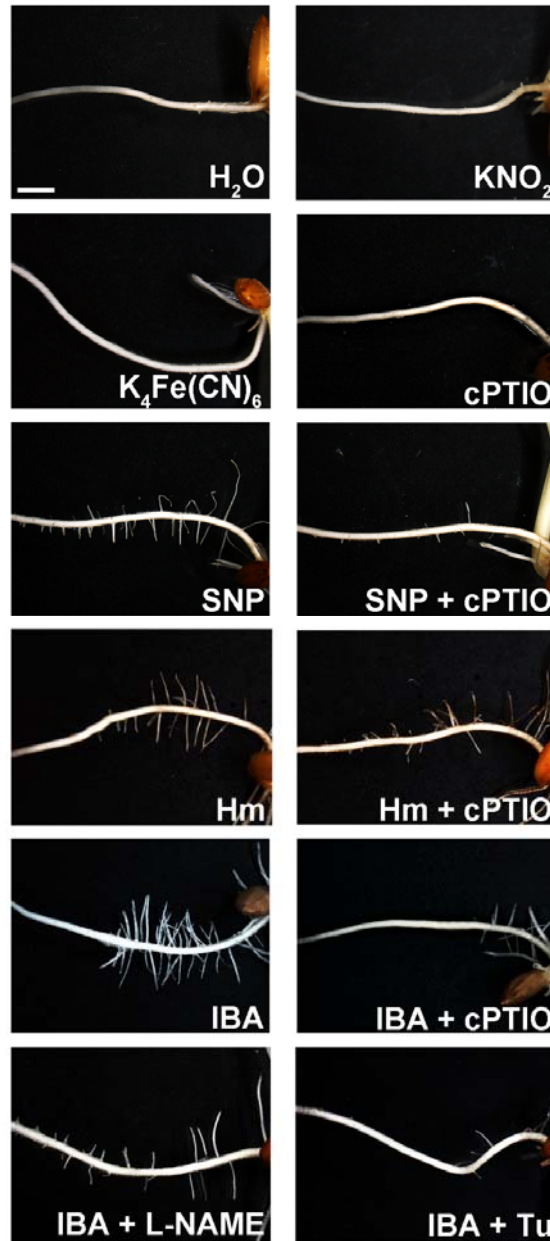


圖 7. cPTIO 對 SNP、IBA 或 Hm 所誘導之水稻黃化幼苗側根形成之影響，與 L-NAME 及 Tu 對 IBA 所誘導之水稻黃化幼苗側根形成之影響。以黑暗下生長兩天之水稻黃化幼苗為材料，分別處理水、100  $\mu$ M  $\text{KNO}_2$ 、100  $\mu$ M  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 、cPTIO、SNP、SNP + cPTIO、Hm、Hm + cPTIO、IBA、IBA + cPTIO、IBA + L-NAME 或 IBA + Tu，cPTIO、SNP、IBA、Hm、L-NAME 與 Tu 之濃度分別為 100  $\mu$ M、500  $\mu$ M、1  $\mu$ M、1 mM 與 1 mM，於處理後三天進行觀察並拍照。每試驗處理四重複。Bar= 1 cm。

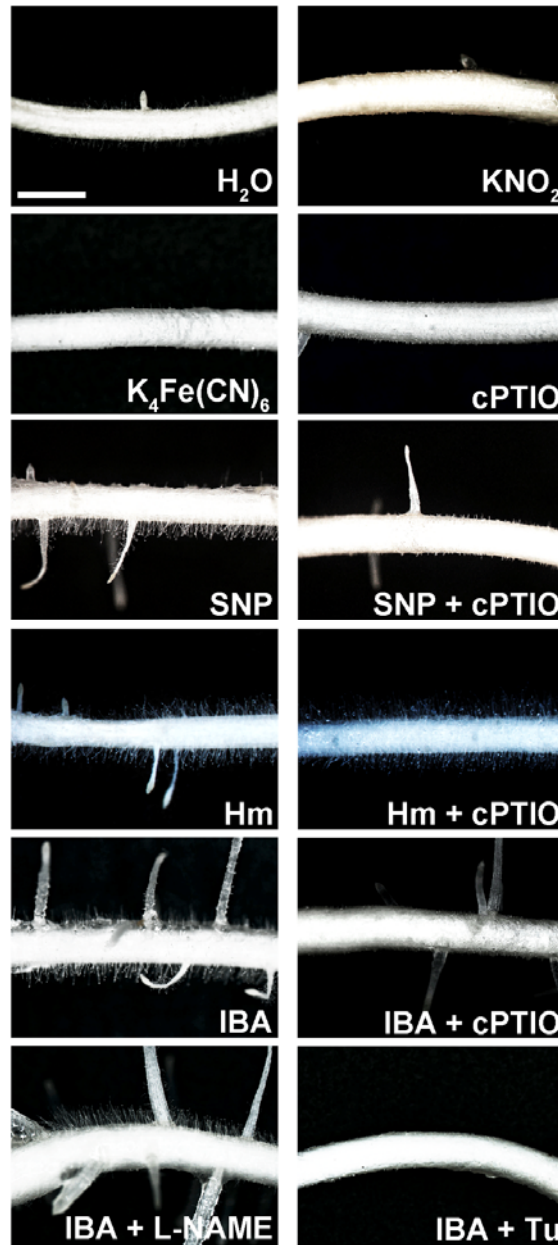
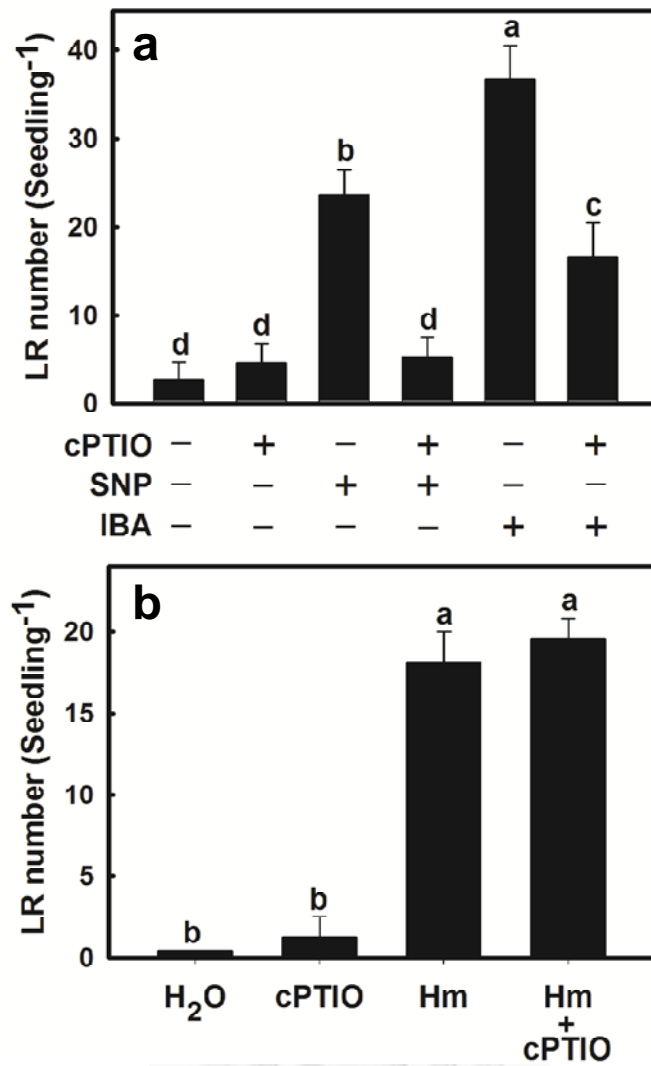


圖 8. cPTIO 對 SNP、IBA 或 Hm 所誘導之水稻黃化幼苗根毛形成之影響，與 L-NAME 及 Tu 對 IBA 所誘導之水稻黃化幼苗根毛形成之影響。以黑暗下生長兩天之水稻黃化幼苗為材料，分別處理水、100  $\mu\text{M}$   $\text{KNO}_2$ 、100  $\mu\text{M}$   $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 、cPTIO、SNP、SNP + cPTIO、Hm、Hm + cPTIO、IBA、IBA + cPTIO、IBA + L-NAME 或 IBA + Tu，cPTIO、SNP、IBA、Hm、L-NAME 與 Tu 之濃度分別為 100  $\mu\text{M}$ 、500  $\mu\text{M}$ 、1  $\mu\text{M}$ 、1 mM 與 1 mM，於處理後三天進行觀察，並取距種子根基部約一公分之根進行拍照。每試驗處理四重複。Bar= 1 mm。



**圖 9.** cPTIO 對 SNP、IBA (a)或 Hm (b)所誘導之水稻黃化幼苗側根數量之影響。以黑暗下生長兩天之水稻黃化幼苗為材料，分別處理水、cPTIO、SNP、SNP + cPTIO、Hm、Hm + cPTIO、IBA、IBA + cPTIO，cPTIO、SNP、IBA 與 Hm 之濃度分別為 100  $\mu$ M、500  $\mu$ M 與 1  $\mu$ M，於處理後三天計算其種子根上之側根數量。每試驗處理四重複，垂直線距表示標準差，相同字母表示處理間無顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

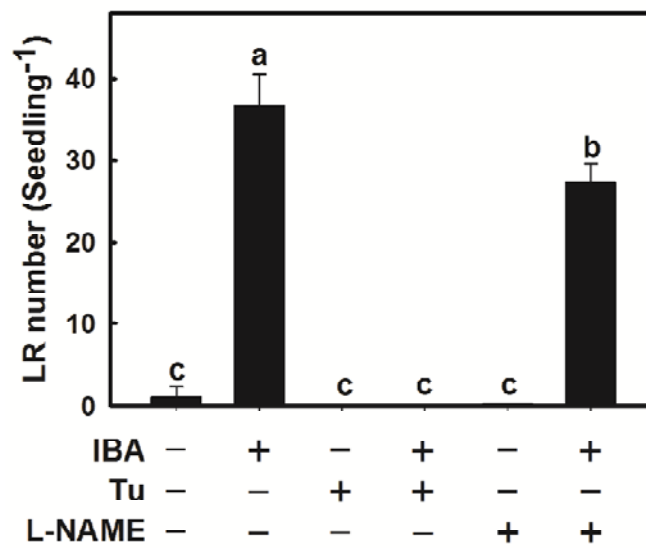


圖 10. L-NAME 與 Tu 對 IBA 所誘導之水稻黃化幼苗側根數量之影響。以黑暗下生長兩天之水稻黃化幼苗為材料，分別處理水、L-NAME、Tu、IBA、IBA + L-NAME 與 IBA + Tu，L-NAME、Tu 與 IBA 之濃度分別為 1 mM、1 mM 與 1  $\mu$ M，於處理後三天計算其種子根上之側根數量。每試驗處理四重複，垂直線距表示標準差，相同字母表示處理間無顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

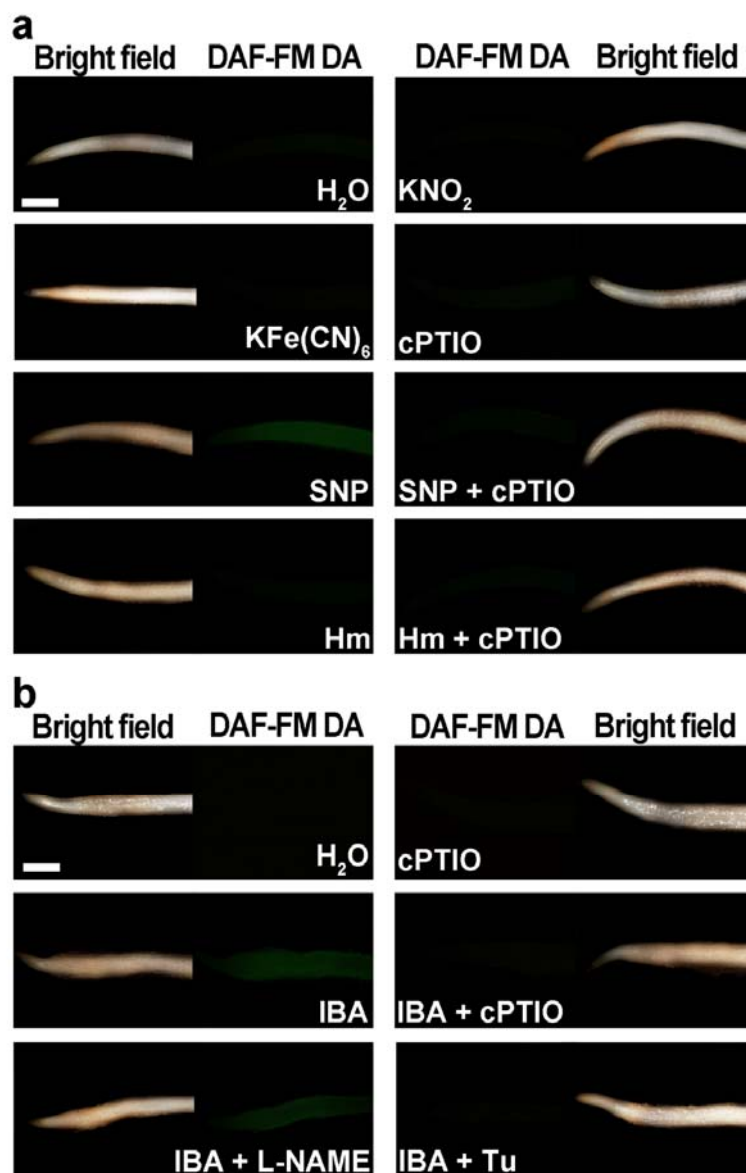
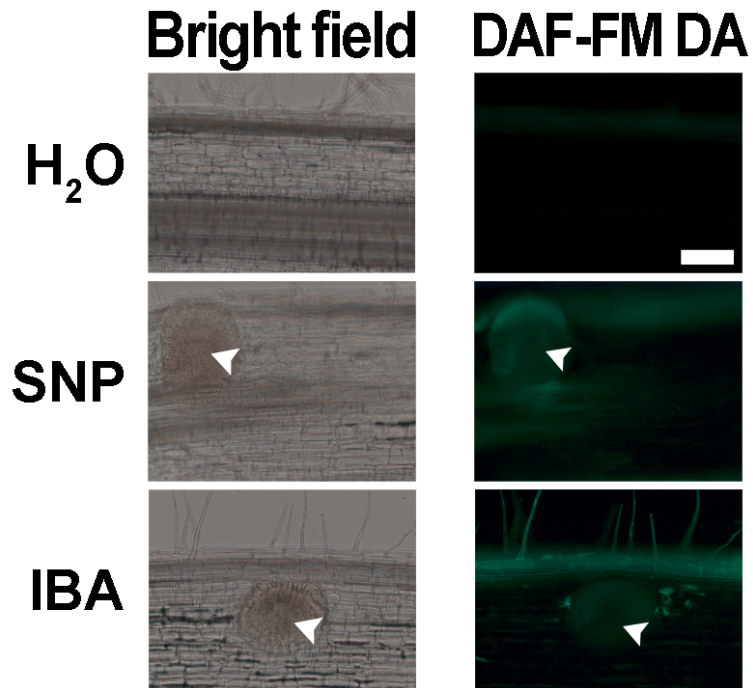
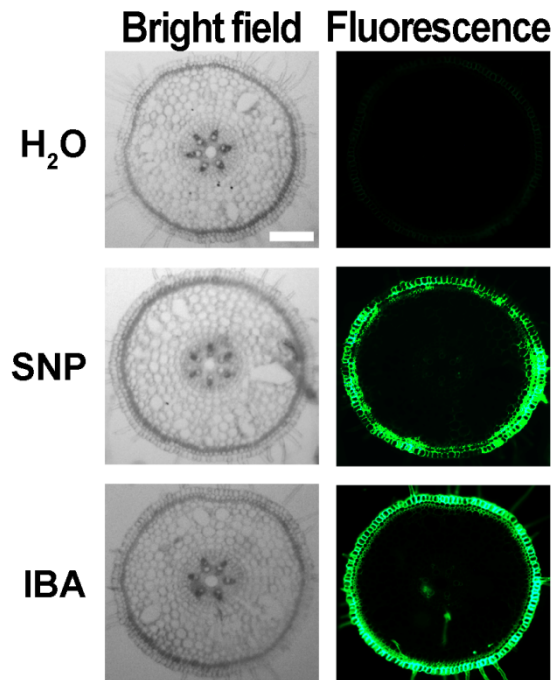


圖 11. cPTIO 對 SNP、IBA 或 Hm 所誘導之水稻黃化幼苗中一氧化氮生成之影響，及 L-NAME 及 Tu 對 IBA 所誘導之水稻黃化幼苗中一氧化氮生成之影響。以黑暗中生長兩天之水稻黃化幼苗為材料，(a) 處理水、100  $\mu$ M KNO<sub>2</sub>、100  $\mu$ M K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>、cPTIO、SNP、SNP + cPTIO、Hm、Hm + cPTIO 6 小時，(b) 處理水、cPTIO、IBA、IBA + cPTIO、IBA + L-NAME 或 IBA + Tu 24 小時，cPTIO、SNP、IBA、Hm、L-NAME 與 Tu 之濃度分別為 100  $\mu$ M、500  $\mu$ M、1  $\mu$ M、1 mM 與 1 mM，於處理後取根尖一公分以 20  $\mu$ M DAF-FM DA 染色後觀察並拍照。每試驗處理四重複。Bar= 1 mm。



**圖 12.** SNP 與 IBA 所誘導之一氧化氮生成於水稻黃化幼苗種子根中之分布與側根形成部位之關係。以黑暗下生長兩天之水稻黃化幼苗為材料，處理水、500  $\mu$ M SNP 與 1  $\mu$ M IBA 42 小時後，取距種子根基部一公分之根以 20  $\mu$ M DAF-FM DA 染色後進行縱切並拍照。白色箭頭所指為側根根原基。每試驗處理四重複。Bar= 0.2 mm。



**圖 13.** SNP 與 IBA 所誘導之一氧化氮生成於水稻黃化幼苗種子根中之分布與根毛形成部位之關係。以黑暗下生長兩天之水稻黃化幼苗為材料，處理水、500  $\mu$ M SNP 與 1  $\mu$ M IBA 24 小時後，取距種子根基部一公分之根以 20  $\mu$ M DAF-FM DA 染色後進行橫切並拍照。每試驗處理四重複。*Bar*= 0.5 mm。

### (三) SNP 與 IBA 誘導水稻黃化幼苗根側根與根毛之形成與 $\text{Ca}^{2+}$ 之關係

為了瞭解  $\text{Ca}^{2+}$  是否參與在 SNP 與 IBA 誘導水稻黃化幼苗側根及根毛形成之途徑中，水稻黃化幼苗以  $\text{Ca}^{2+}$  螯合物 100  $\mu\text{M}$  EGTA、100  $\mu\text{M}$  BAPTA (membrane-permeable) 或 100  $\mu\text{M}$  BAPTA/AM (membrane-impermeable) 前處理三小時後，分別移至水、SNP 與 IBA 處理三天後進行觀察。結果顯示，這三個  $\text{Ca}^{2+}$  螯合物皆可明顯抑制 SNP 與 IBA 所誘導之側根 (圖 14a) 與根毛 (圖 15) 的形成，這說明細胞間與細胞質中之  $\text{Ca}^{2+}$  參與在 SNP 與 IBA 誘導水稻黃化幼苗側根及根毛形成之途徑中。水稻黃化幼苗以  $\text{Ca}^{2+}$  通道阻礙劑 500  $\mu\text{M}$   $\text{LaCl}_3$ 、100  $\mu\text{M}$  verapamil 與 50  $\mu\text{M}$  RR 前處理三小時後，後分別移至水、SNP 與 IBA 處理三天後進行觀察。結果顯示，這三個  $\text{Ca}^{2+}$  通道阻礙劑皆可明顯抑制 SNP 與 IBA 所誘導之側根 (圖 14a) 與根毛 (圖 15) 的形成。

$\text{Ca}^{2+}$  由液胞與胞器釋放到細胞質中之過程需要 inositol triphosphate ( $\text{IP}_3$ )，水稻黃化幼苗以  $\text{IP}_3$  合成抑制劑 50  $\mu\text{M}$  NEO (抑制 phospholipase C) 與 5 mM LiCl (抑制  $\text{IP}_3$  循環) 前處理三小時後，後分別移至水、SNP 與 IBA 處理三天後進行觀察。結果顯示 NEO 與 LiCl 皆可明顯抑制 SNP 與 IBA 所誘導之側根 (圖 14b) 與根毛 (圖 15) 的形成。而以 CaM 拮抗劑 100  $\mu\text{M}$  CPZ 與 100  $\mu\text{M}$  TFP 前處理三小時之水稻黃化幼苗，後分別移至水、SNP 與 IBA 處理三天後進行觀察。結果顯示，CPZ 與 TFP 同樣可以明顯抑制 SNP 與 IBA 所誘導之側根 (圖 14b) 與根毛 (圖 15) 的形成。

為了確定  $\text{Ca}^{2+}$  與 SNP 及 IBA 誘導之一氧化氮生成的關係，我們以 BAPTA、BAPTAAM、RR 與 LiCl 前處理三小時後之水稻黃化幼苗，分別移至水、SNP 與 IBA 處理 24 小時後，取種子根以螢光探針 DAF-FM DA 處理，發現這些抑制劑皆沒有辦法抑制 SNP 與 IBA 所誘導之一氧化氮的合成 (圖 16)。

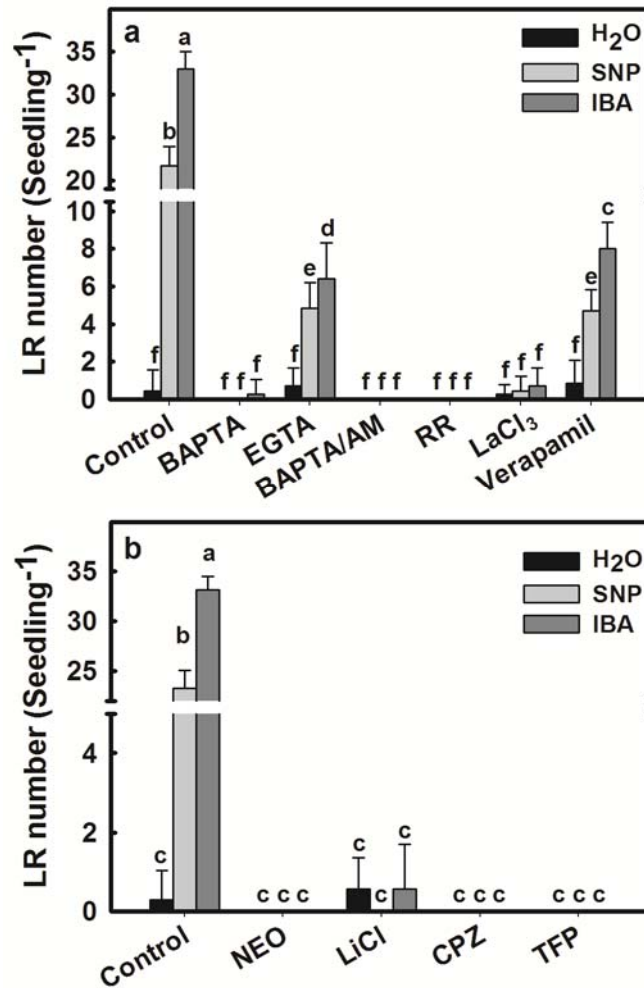


圖 14. Ca<sup>2+</sup>螯合物、Ca<sup>2+</sup>通道阻礙劑、IP<sub>3</sub>與CaM拮抗劑對SNP及IBA所誘導之水稻黃化幼苗側根數量之影響。以黑暗下生長兩天之水稻黃化幼苗為材料，分別前處理(a) 100  $\mu$ M BAPTA、100  $\mu$ M EGTA、100  $\mu$ M BAPTA/AM、50  $\mu$ M RR、500  $\mu$ M LaCl<sub>3</sub>、100  $\mu$ M verapamil、(b) 50  $\mu$ M NEO、5 mM LiCl、100  $\mu$ M CPZ 或 100  $\mu$ M TFP 三小時後，移至水、500  $\mu$ M SNP 或 1  $\mu$ M IBA 處理三天，計算其種子根上之側根數量。每試驗處理四重複，垂直線距表示標準差，相同字母表示處理間無顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

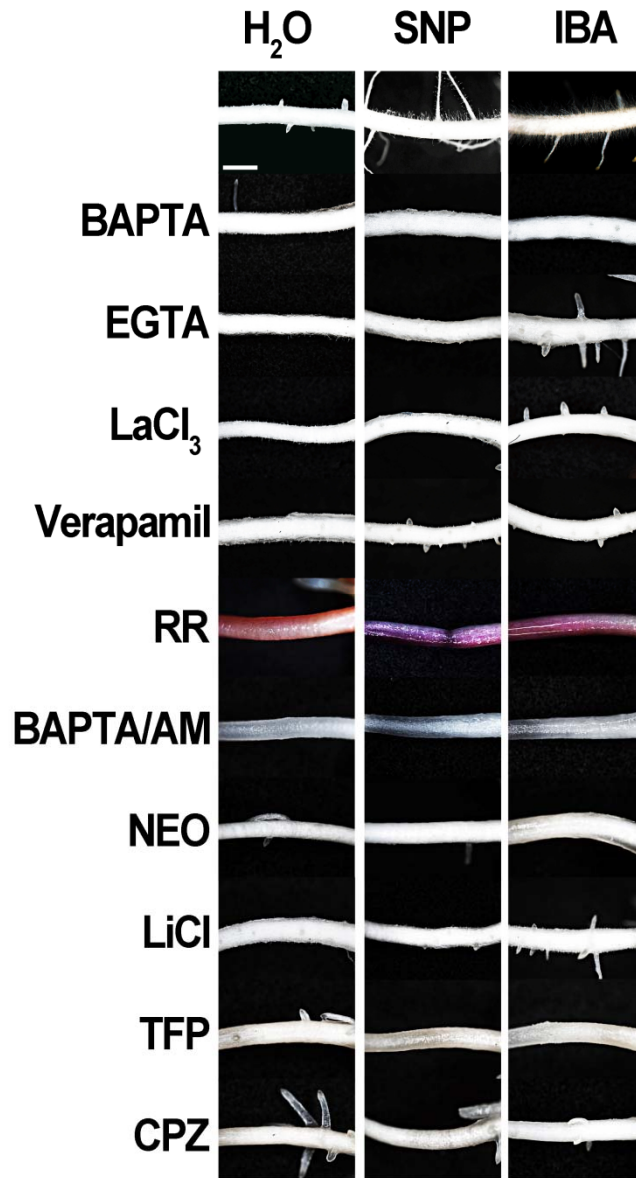


圖 15.  $\text{Ca}^{2+}$ 螯合物、 $\text{Ca}^{2+}$ 通道阻礙劑、 $\text{IP}_3$  與  $\text{CaM}$  拮抗劑對 SNP 及 IBA 所誘導之水稻黃化幼苗根毛形成之影響。以黑暗下生長兩天之水稻黃化幼苗為材料，分別前處理 100  $\mu\text{M}$  BAPTA、100  $\mu\text{M}$  EGTA、100  $\mu\text{M}$  BAPTA/AM、50  $\mu\text{M}$  RR、500  $\mu\text{M}$   $\text{LaCl}_3$ 、100  $\mu\text{M}$  verapamil、50  $\mu\text{M}$  NEO、5 mM LiCl、100  $\mu\text{M}$  CPZ 或 100  $\mu\text{M}$  TFP 三小時後，移至水、500  $\mu\text{M}$  SNP 或 1  $\mu\text{M}$  IBA 處理三天後進行觀察，並取距種子根基部約一公分之根進行拍照。每試驗處理四重複。Bar= 1 mm。

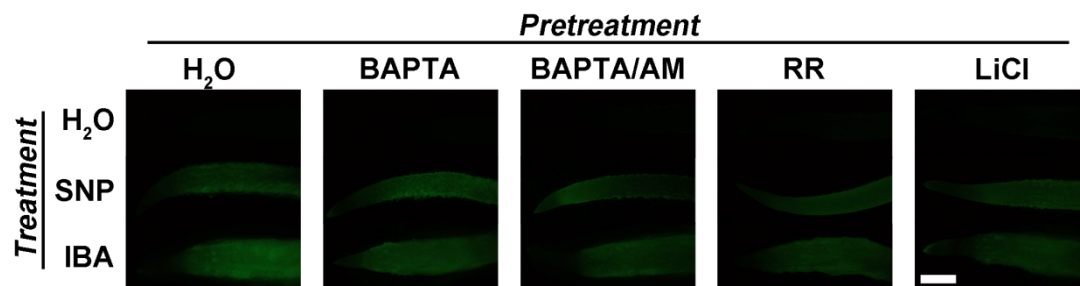


圖 16.  $\text{Ca}^{2+}$ 螯合物與  $\text{Ca}^{2+}$ 通道阻礙劑對 SNP 及 IBA 所誘導之水稻黃化幼苗一氧化氮合成之影響。以黑暗下生長兩天之水稻黃化幼苗為材料，分別前處理 100  $\mu\text{M}$  BAPTA、100  $\mu\text{M}$  BAPTA/AM、50  $\mu\text{M}$  RR 與 5 mM LiCl 三小時後，移至水、500  $\mu\text{M}$  SNP 或 1  $\mu\text{M}$  IBA 處理 24 小時後進行觀察，並取根尖一公分之根進行拍照。每試驗處理四重複。Bar= 1 mm。



#### (四) 一氧化氮清除劑、一氧化氮合成抑制劑、 $\text{Ca}^{2+}$ 螯合物、 $\text{Ca}^{2+}$ 通道阻礙劑、 $\text{IP}_3$ 合成抑制劑與 CaM 拮抗劑對根細胞活力之影響

為了檢驗本論文之試驗所使用之抑制劑是否會對水稻黃化幼苗根造成毒害作用，進而影響試驗之結果，故以 Evans blue 染色法測試其對根細胞活力之影響。本研究室過去發表之數據顯示氯化鎘 ( $\text{CdCl}_2$ ) 會導致水稻根細胞死亡，而本論文之試驗結果也發現水稻黃化幼苗根處理 0.1 mM  $\text{CdCl}_2$  六小時後 (表 1)， $A_{595}$  明顯的提升，顯示本文所使用之方法可以有效的測定根細胞活力。如表 1 所示，一氧化氮清除劑 (cPTIO)、一氧化氮合成抑制劑 (Tu、LNAME)、 $\text{Ca}^{2+}$ 螯合物 (EGTA、BAPTA、BAPTA/AM)、 $\text{Ca}^{2+}$ 通道阻礙劑 ( $\text{LaCl}_3$ 、verapamil、RR)、 $\text{IP}_3$ 合成抑制劑 (NEO、LiCl) 與 CaM 拮抗劑 (CPZ、TFP) 皆不影響根細胞之活力。



表 1. 氯化鎘、一氧化氮清除劑、一氧化氮合成抑制劑、Ca<sup>2+</sup>螯合物、Ca<sup>2+</sup>通道阻礙劑、IP<sub>3</sub> 合成抑制劑與 CaM 拮抗劑對水稻黃化幼苗根細胞活力之影響。

Expt.	Treatment	Root Cell Viability ( <i>A</i> <sub>595</sub> )
I	H <sub>2</sub> O	0.013 ± 0.0030 <sup>a</sup>
	CdCl <sub>2</sub>	0.022 ± 0.0016 <sup>b</sup>
II	H <sub>2</sub> O	0.012 ± 0.0026 <sup>ab</sup>
	c-PTIO	0.010 ± 0.0011 <sup>b</sup>
	Tu	0.012 ± 0.0034 <sup>ab</sup>
	L-NAME	0.012 ± 0.0021 <sup>ab</sup>
	BAPTA	0.011 ± 0.0029 <sup>ab</sup>
	EGTA	0.010 ± 0.0015 <sup>ab</sup>
	BAPTA/AM	0.013 ± 0.0011 <sup>a</sup>
	RR	0.013 ± 0.0018 <sup>a</sup>
	LaCl <sub>3</sub>	0.011 ± 0.0011 <sup>ab</sup>
	Verapamil	0.011 ± 0.0016 <sup>ab</sup>
	NEO	0.011 ± 0.0023 <sup>ab</sup>
	LiCl	0.010 ± 0.0020 <sup>b</sup>
	CPZ	0.010 ± 0.0013 <sup>b</sup>
	TFP	0.011 ± 0.0017 <sup>ab</sup>

細胞活力測定方法主要根據 Baker 與 Mock (1994) 之方法修改而成，以 Evans blue 處理後測波長 595 nm 的吸光值，即可代表細胞之活力，吸光值愈高則表示細胞活力越低。試驗一：兩天大之水稻黃化幼苗處理水或 CdCl<sub>2</sub> 六小時；試驗二：兩天大之水稻黃化幼苗處理水、100 μM cPTIO、1 mM Tu、1mM L-NAME、100 μM BAPTA、100 μM EGTA、100 μM BAPTA/AM、50 μM RR、500 μM LaCl<sub>3</sub>、100 μM verapamil、50 μM NEO、5 mM LiCl、100 μM CPZ 或 100 μM TFP 三小時。結果為平均值加減標準差，相同字母表示處理間無顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

### **(五) SNP、IBA 與 Hm 對 heme oxygenase 活性之影響**

在動物中 Hm 可以活化 HO 之活性進而增加一氧化碳的合成，因此被認為是一氧化碳的 donor。在本論文之試驗中，同樣發現 Hm 可以增加水稻黃化幼苗根中 HO 之活性 (圖 17)，結果顯示在 Hm 處理一天之後，HO 之活性即有明顯的提升，而隨著處理時間的增加 HO 之活性也隨之變高。為了瞭解 SNP 與 IBA 是否會影響 HO 之活性，我們將兩天大之水稻黃化幼苗處理 SNP 與 IBA，於處理一、二、三天之後分別測其 HO 之活性，結果發現在水稻黃化幼苗根中，SNP 與 IBA 處理同樣在一天後即可明顯使得 HO 之活性增高 (圖 18)。

### **(六) ZnPIX 與 hemoglobin 對 SNP、IBA 與 Hm 所誘導之水稻黃化幼苗側根與根毛之形成與 heme oxygenase 活性增加之影響**

前人研究指出 ZnPIX 可以抑制植物中 HO 之活性 (Liu *et al.*, 2007; Xuan *et al.*, 2008)。本論文之試驗結果也發現，前處理 200  $\mu$ M ZnPIX 可以有效抑制 SNP、IBA 與 Hm 所引起的 HO 活性的增加 (圖 19)，同時 SNP、IBA 與 Hm 所誘導之水稻黃化幼苗側根與根毛的形成也受到 ZnPIX 的作用而顯著的被抑制 (圖 20、圖 21)。Hb 長期被用來作為一氧化氮與一氧化碳的清除劑，前處理 0.14 g L<sup>-1</sup> Hb 也可有效抑制 SNP、IBA 與 Hm 所引起的 HO 活性的增加 (圖 22)，同時 SNP、IBA 與 Hm 所誘導之水稻黃化幼苗側根與根毛的形成也受到 Hb 的作用而完全的被抑制 (圖 23、圖 24)。

### **(七) Biliverdin IX $\alpha$ 對水稻黃化幼苗側根與根毛之形成與 heme oxygenase 活性之影響**

BV 為 HO 所催化反應之產物之一，為了瞭解 BV 對於水稻黃化幼苗側根與根毛形成之影響，將其處理不同濃度之 BV (10、20、30 與 40  $\mu$ M) 三天後，發現 BV 可以有效促進水稻側根與根毛之形成 (圖 25、圖 26) 與提升 HO 活性 (圖 27)。

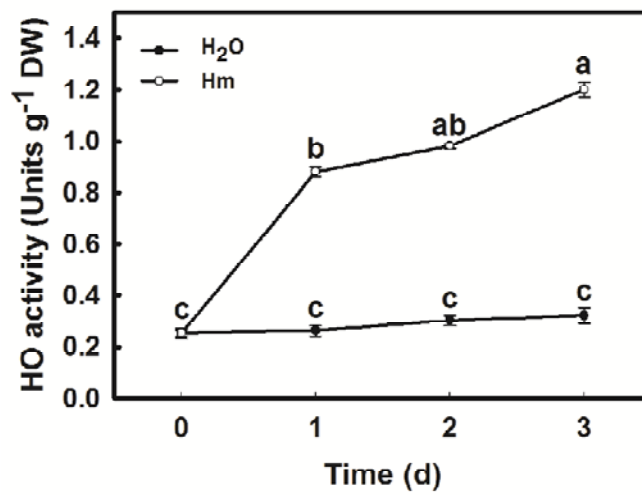


圖 17. Hm 對 HO 活性之影響。以黑暗中生長兩天之水稻黃化幼苗為材料，分別處理水或 10  $\mu$ M Hm，於處理後一、二、三天分別分析其種子根之 HO 活性。每試驗處理四重複，垂直線距表示標準差，相同字母表示處理間無顯著差異 ( $P < 0.05$ )。



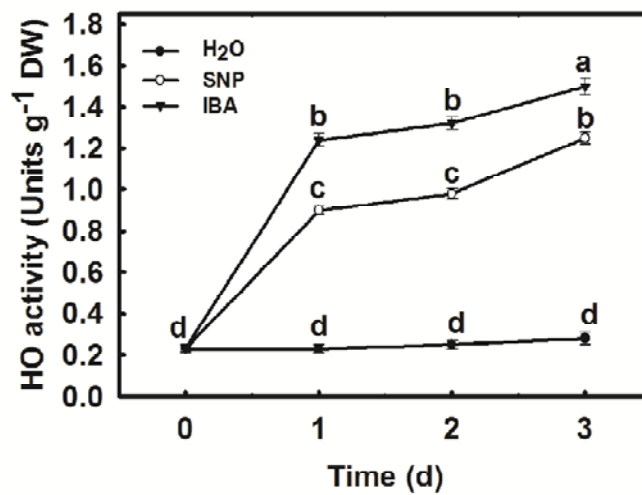
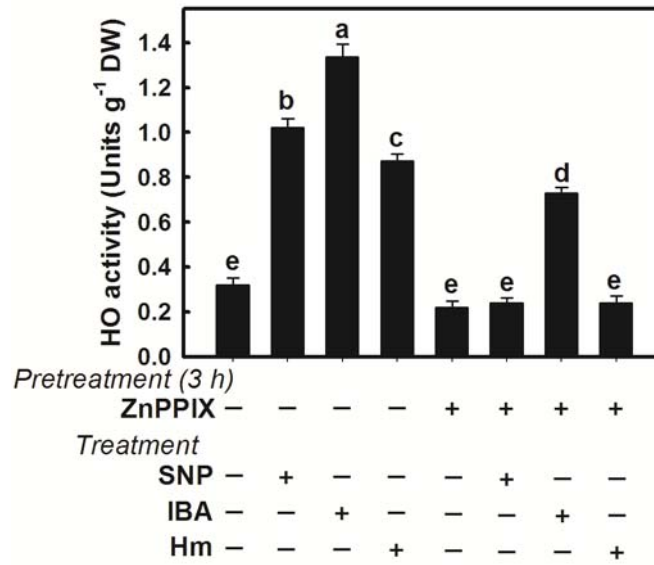


圖 18. SNP 與 IBA 對 HO 活性之影響。以黑暗下生長兩天之水稻黃化幼苗為材料，分別處理水、500  $\mu$ M SNP 或 1  $\mu$ M IBA，於處理後一、二、三天分別分析其種子根之 HO 活性。每試驗處理四重複，垂直線距表示標準差，相同字母表示處理間無顯著差異 ( $P < 0.05$ )。





**圖 19.** ZnPPIX 對 SNP、IBA 與 Hm 所誘導之水稻黃化幼苗根 HO 活性之影響。以黑暗下生長兩天之水稻黃化幼苗為材料，分別前處理水與 200  $\mu$ M ZnPPIX 三小時後，移至水、500  $\mu$ M SNP、1  $\mu$ M IBA 或 10  $\mu$ M Hm 處理一天，分析其種子根之 HO 活性。每試驗處理四重複，垂直線距表示標準差，相同字母表示處理間無顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

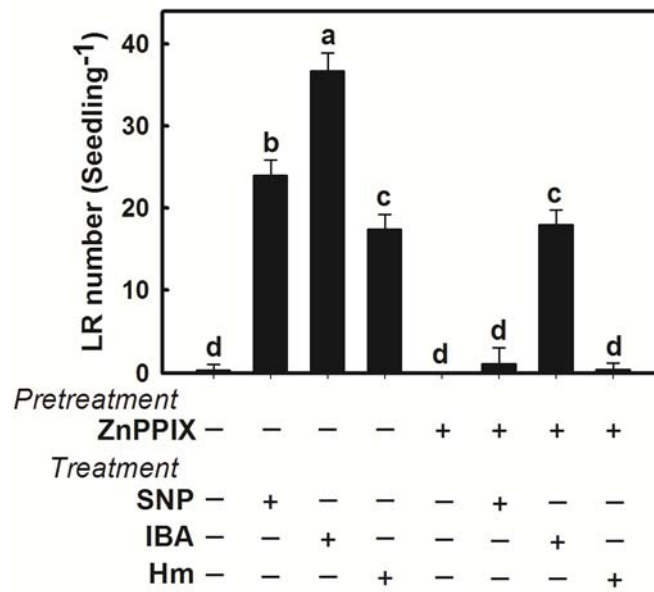


圖 20. ZnPIX 對 SNP、IBA 與 Hm 所誘導之水稻黃化幼苗側根形成數量之影響。

以黑暗下生長兩天之水稻黃化幼苗為材料，分別前處理水與 200  $\mu$ M ZnPIX 三小時後，移至水、500  $\mu$ M SNP、1  $\mu$ M IBA 或 10  $\mu$ M Hm 處理三天，計算其種子根上之側根數量。每試驗處理四重複，垂直線距表示標準差，相同字母表示處理間無顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

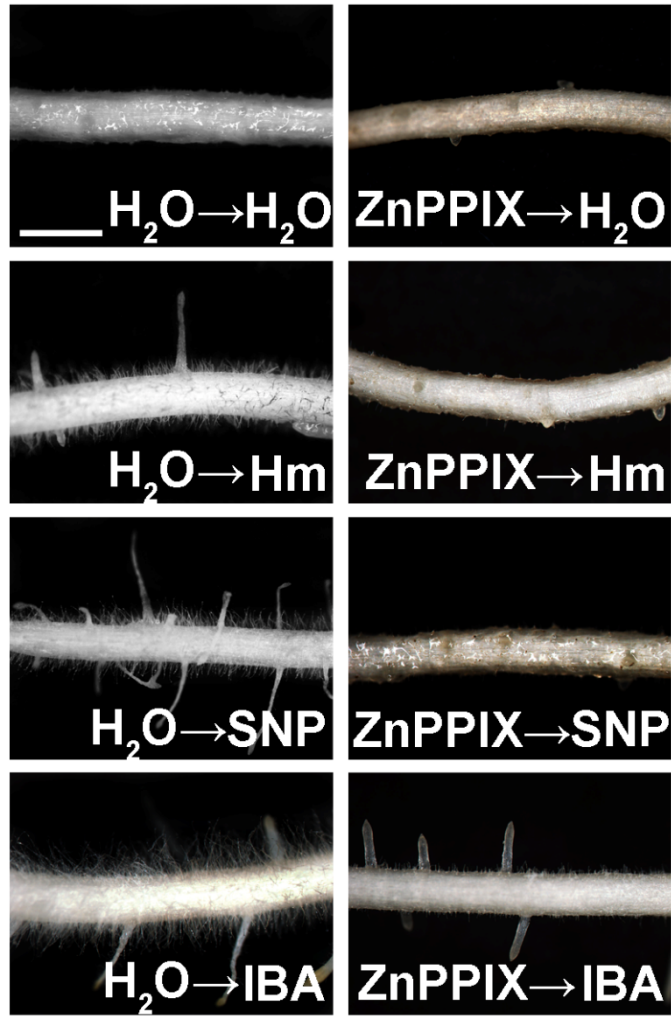


圖 21. ZnPPiX 對 SNP、IBA 與 Hm 所誘導之水稻黃化幼苗根毛形成之影響。以黑暗下生長兩天之水稻黃化幼苗為材料，分別前處理水與 200  $\mu\text{M}$  ZnPPiX 三小時後，移至水、500  $\mu\text{M}$  SNP、1  $\mu\text{M}$  IBA 或 10  $\mu\text{M}$  Hm 處理三天後進行觀察，並取距種子根基部約一公分之根進行拍照。每試驗處理四重複。Bar= 1 mm。

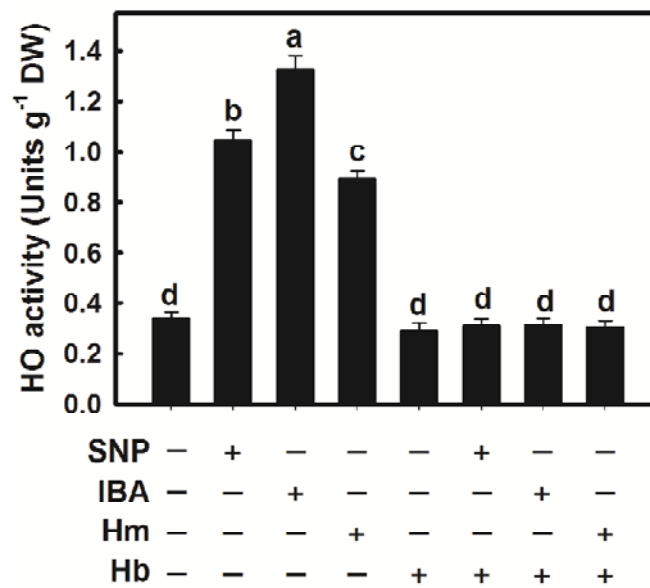


圖 22. Hb 對 SNP、IBA 與 Hm 所誘導之水稻黃化幼苗根 HO 活性之影響。以黑暗下生長兩天之水稻黃化幼苗為材料，處理水、SNP、IBA、Hm、Hb、SNP + Hb、IBA + Hb、Hm + Hb 一天後，分析其種子根之 HO 活性，SNP、IBA、Hm 與 Hb 之濃度分別為 500  $\mu\text{M}$ 、1  $\mu\text{M}$ 、10  $\mu\text{M}$  與 0.14  $\text{g L}^{-1}$ 。每試驗處理四重複，垂直線距表示標準差，相同字母表示處理間無顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

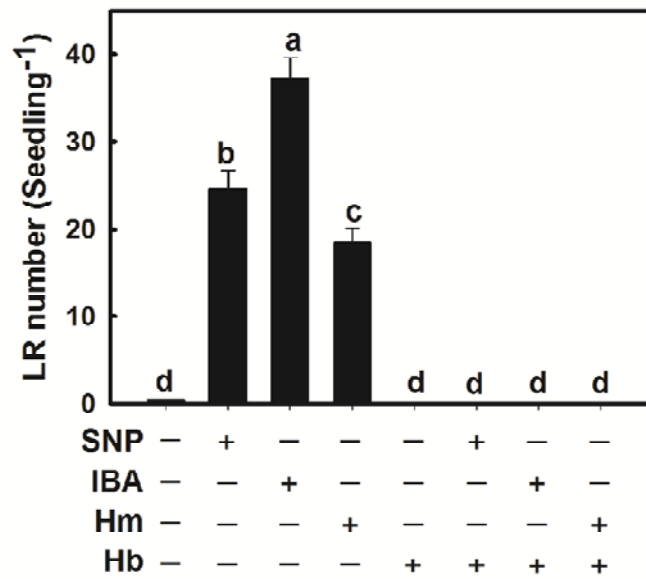


圖 23. Hb 對 SNP、IBA 與 Hm 所誘導之水稻黃化幼苗側根形成數量之影響。以黑暗下生長兩天之水稻黃化幼苗為材料，處理水、SNP、IBA、Hm、Hb、SNP + Hb、IBA + Hb、Hm + Hb 三天後，計算其種子根上之側根數量，SNP、IBA、Hm 與 Hb 之濃度分別為 500  $\mu\text{M}$ 、1  $\mu\text{M}$ 、10  $\mu\text{M}$  與 0.14  $\text{g L}^{-1}$ 。每試驗處理四重複，垂直線距表示標準差，相同字母表示處理間無顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

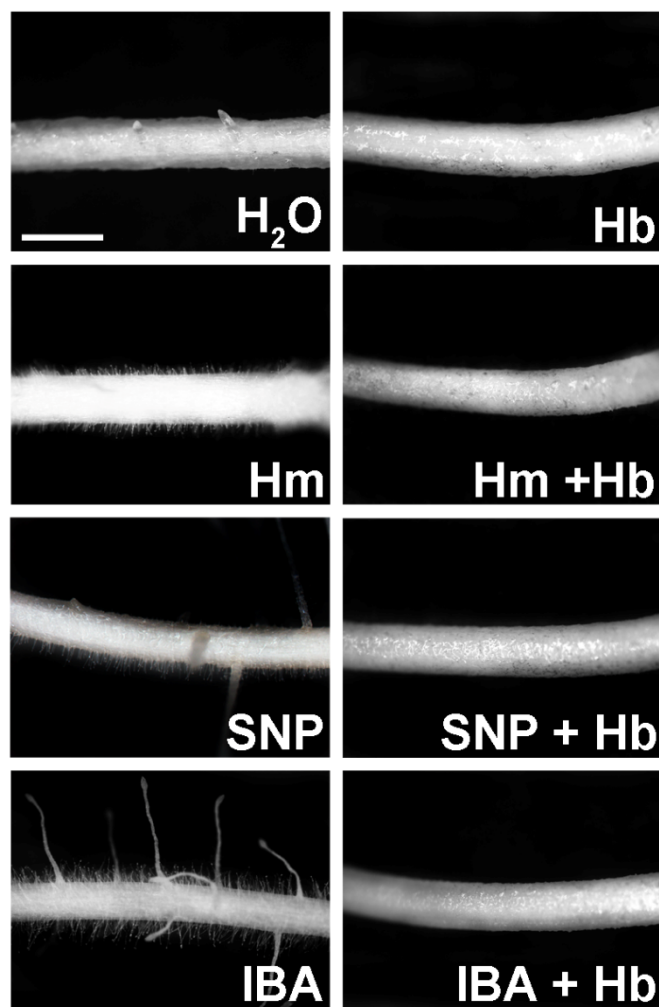


圖 24. Hb 對 SNP、IBA 與 Hm 所誘導之水稻黃化幼苗根毛形成之影響。以黑暗中生長兩天之水稻黃化幼苗為材料，處理水、SNP、IBA、Hm、Hb、SNP + Hb、IBA + Hb、Hm + Hb 三天後進行觀察，並取距種子根基部約一公分之根進行拍照，SNP、IBA、Hm 與 Hb 之濃度分別為 500  $\mu M$ 、1  $\mu M$ 、10  $\mu M$  與 0.14 g L<sup>-1</sup>。每試驗處理四重複。Bar= 1 mm。

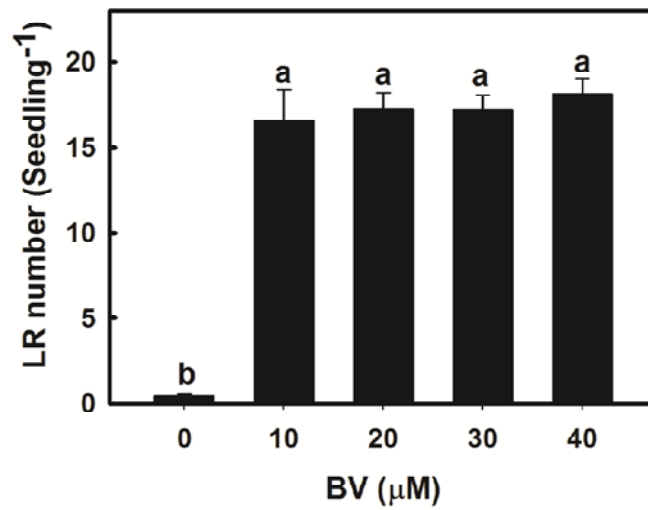


圖 25. BV 對水稻黃化幼苗側根形成數量之影響。以黑暗下生長兩天之水稻黃化幼苗為材料，分別處理水或不同濃度之 BV (10、20、30 或 40  $\mu\text{M}$ ) 三天，計算其種子根上之側根數量。每試驗處理四重複，垂直線距表示標準差，相同字母表示處理間無顯著差異 ( $P < 0.05$ )。



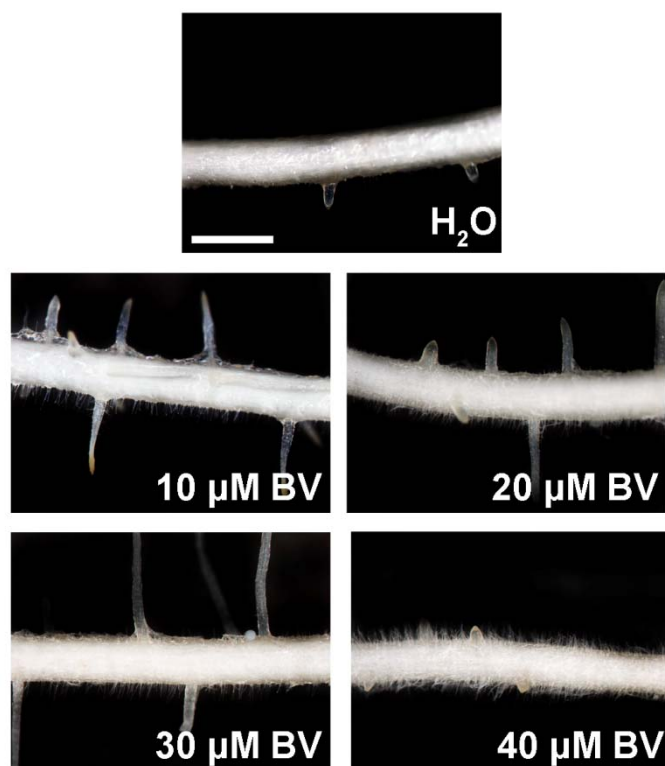


圖 26. BV 對水稻黃化幼苗根毛形成之影響。以黑暗下生長兩天之水稻黃化幼苗為材料，分別處理水或不同濃度之 BV (10、20、30 或 40  $\mu$ M) 三天後進行觀察，並取距種子根基部約一公分之根進行拍照。每試驗處理四重複。Bar= 1 mm。

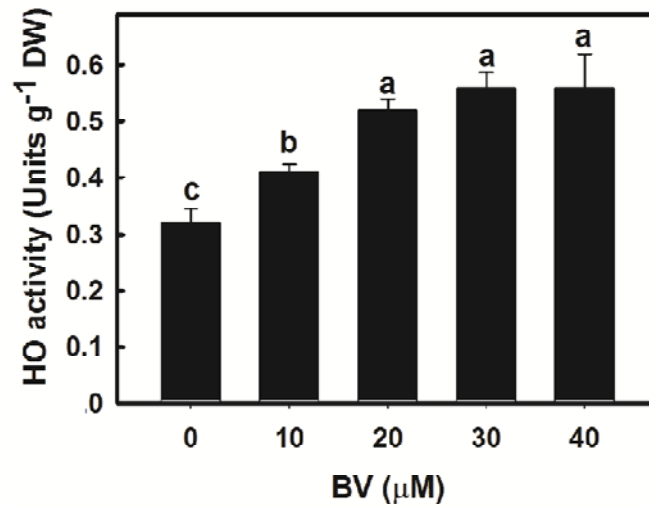


圖 27. BV 對 HO 活性之影響。以黑暗下生長兩天之水稻黃化幼苗為材料，分別處理水及不同濃度之 BV (10、20、30 或 40  $\mu\text{M}$ )，於處理後一天分析其種子根之 HO 活性。每試驗處理四重複，垂直線距表示標準差，相同字母表示處理間無顯著差異 ( $P < 0.05$ )。



## (八) Apocynin 對水稻黃化幼苗側根形成之影響

以不同濃度之 apocynin (1、5、10、20、30  $\mu\text{M}$ )處理在黑暗下生長兩天之水稻黃化幼苗，三天後觀察其種子根上側根形成之情形。試驗結果顯示 apocynin 可誘導水稻黃化幼苗側根 (圖 28)之形成，且於處理濃度為 10  $\mu\text{M}$  時，誘導側根形成情形最佳，故後續之試驗便以此為處理濃度。

## (九) Apocynin 誘導水稻黃化幼苗側根之形成是經由 $\text{H}_2\text{O}_2$ 而非一氧化氮

以螢光探針 DAF-FM DA 與 CM- $\text{H}_2\text{DCFDA}$  分別偵測水稻黃化幼苗根中之一氧化氮與  $\text{H}_2\text{O}_2$ 。如圖 29 所示，apocynin 處理水稻黃化幼苗後，其種子根無法偵測到一氧化氮之螢光 (圖 29a)，而可以偵測到  $\text{H}_2\text{O}_2$  螢光的生成 (圖 29b)，處理 DPI 之後也可以明顯抑制 apocynin 所誘導之  $\text{H}_2\text{O}_2$  螢光的生成 (圖 29b)，然而處理 cPTIO 對 apocynin 所誘導之  $\text{H}_2\text{O}_2$  螢光的生成則沒有影響 (圖 29b)。

為了瞭解 apocynin 與水稻黃化幼苗側根形成與一氧化氮及  $\text{H}_2\text{O}_2$  間之關係，將水稻黃化幼苗前處理 100  $\mu\text{M}$  cPTIO 或 1  $\mu\text{M}$  DPI 三小時後，試驗結果發現 DPI 可以有效抑制 apocynin 所誘導之側根形成數量，而 cPTIO 則沒有作用 (圖 30)，顯示 apocynin 誘導側根形成之過程中需要  $\text{H}_2\text{O}_2$  之參與而非一氧化氮。

為確認  $\text{H}_2\text{O}_2$  與水稻黃化幼苗側根形成之關係，故將水稻黃化幼苗以不同濃度之  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1、2.5、5、7.5  $\mu\text{M}$ )處理，三天後觀察其種子根上側根形成之情形。結果顯示  $\text{H}_2\text{O}_2$  可誘導水稻黃化幼苗側根 (圖 31)之形成，且於處理濃度為 1  $\mu\text{M}$  時，誘導側根形成情形最佳，故後續之試驗便以此為處理濃度。更進一步想確認 apocynin 誘導之  $\text{H}_2\text{O}_2$  生成與側根形成之關係，水稻黃化幼苗以 apocynin 處理後 42 小時，取種子根以螢光探針 CM- $\text{H}_2\text{DCFDA}$  處理後進行縱切，結果發現  $\text{H}_2\text{O}_2$  之螢光分布於側根根原基，即為側根形成之部位 (圖 32)。

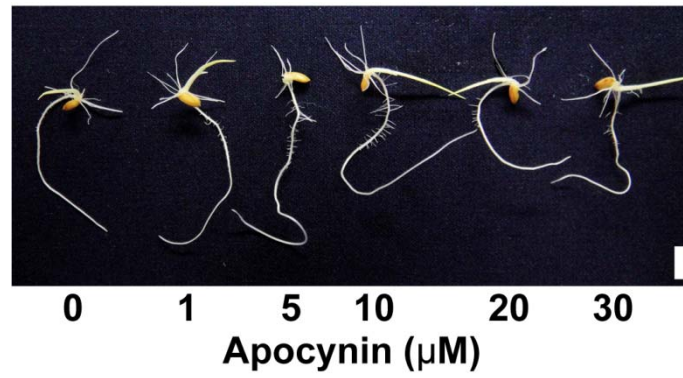
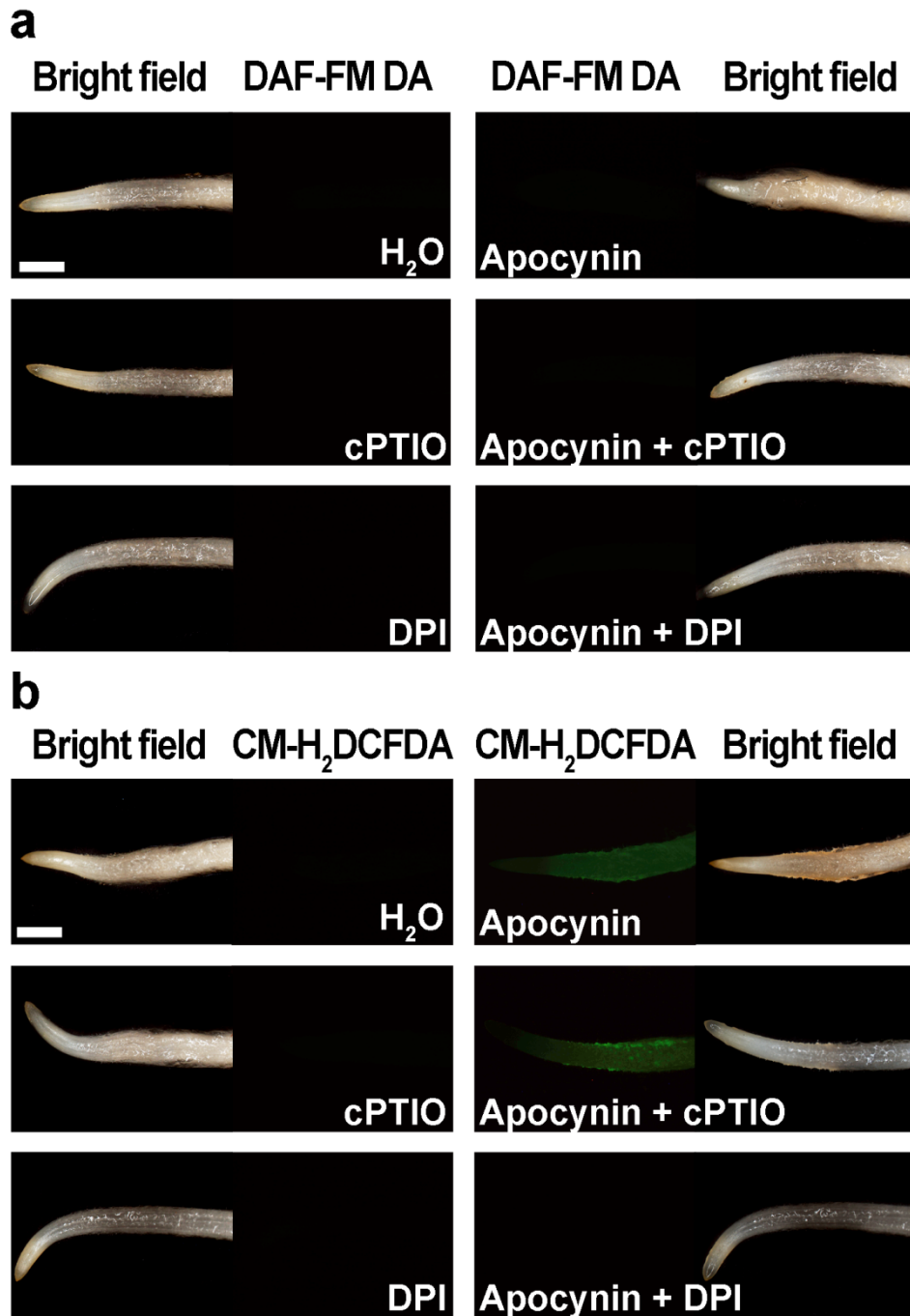


圖 28. 不同濃度 apocynin 對水稻黃化幼苗側根形成之影響。以黑暗下生長兩天之水稻黃化幼苗為材料，處理不同濃度之 apocynin (1、5、10、20、30  $\mu\text{M}$ )，三天後進行觀察並拍照。每試驗處理四重複。Bar= 1 cm。





**圖 29.** cPTIO 與 DPI 對 apocynin 處理後水稻黃化幼苗中一氧化氮 (a)與 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (b) 之影響。以黑暗下生長兩天之水稻黃化幼苗為材料，處理水、apocynin、cPTIO、apocynin + cPTIO、DPI、apocynin + DPI 24 小時，apocynin、cPTIO 與 DPI 之濃度分別為 10 μM、100 μM 與 1 μM，於處理後取根尖一公分以 20 μM DAF-FM DA 或 50 μM CM-H<sub>2</sub>DCFDA 染色後觀察並拍照。每試驗處理四重複。Bar= 1 mm。

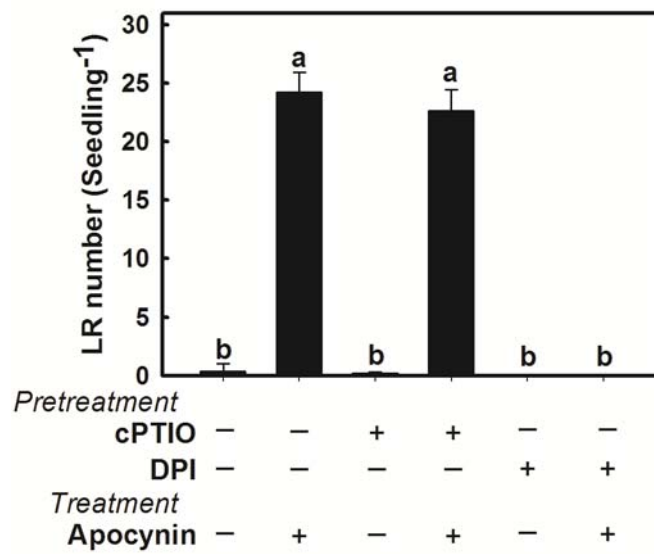
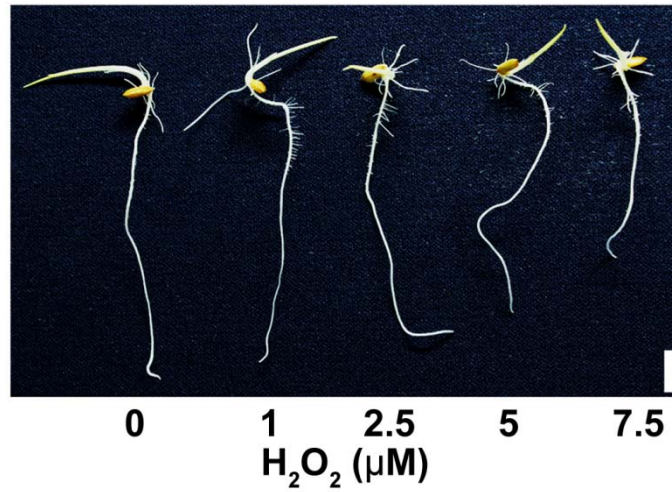
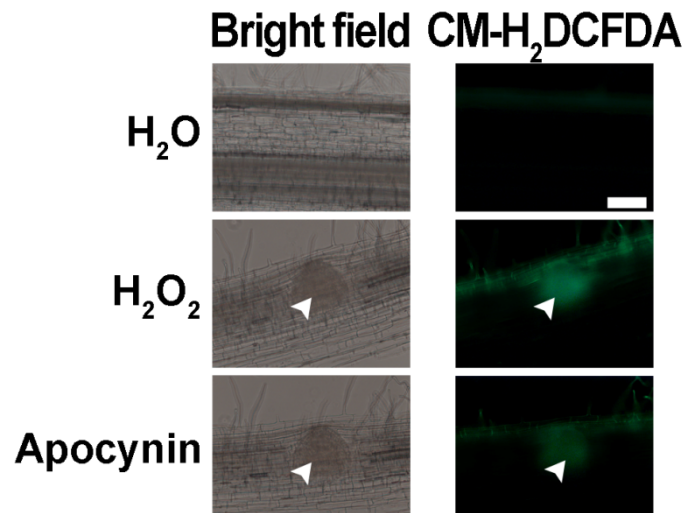


圖 30. cPTIO 與 DPI 對 apocynin 所誘導之水稻黃化幼苗側根數量之影響。以黑暗中生長兩天之水稻黃化幼苗為材料，分別處理水、apocynin、cPTIO、apocynin + cPTIO、DPI、apocynin + DPI，apocynin、cPTIO 與 DPI 之濃度分別為 10  $\mu$ M、100  $\mu$ M 與 1  $\mu$ M，於處理三天後計算其種子根上之側根數量。每試驗處理四重複，垂直線距表示標準差，相同字母表示處理間無顯著差異 ( $P < 0.05$ )。



**圖 31.** 不同濃度  $\text{H}_2\text{O}_2$  對水稻黃化幼苗側根形成之影響。以黑暗下生長兩天之水稻黃化幼苗為材料，處理不同濃度之  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1、2.5、5、7.5  $\mu\text{M}$ )，三天後進行觀察並拍照。每試驗處理四重複。Bar= 1 cm。





**圖 32.** Apocynin 所誘導之  $\text{H}_2\text{O}_2$  生成於水稻黃化幼苗種子根中之分布與側根形成部位之關係。以黑暗下生長兩天之水稻黃化幼苗為材料，處理水、 $1\ \mu\text{M}\ \text{H}_2\text{O}_2$  與  $10\ \mu\text{M}$  apocynin 42 小時後，取距種子根基部一公分之根以  $50\ \mu\text{M}$  CM- $\text{H}_2\text{DCFDA}$  染色後進行縱切並拍照。白色箭頭所指為側根根原基。每試驗處理四重複。Bar=  $0.2\ \text{mm}$ 。



## 討論

Pagnussat 等人 (2002)首度指出在小黃瓜不定根形成之過程中，生長素與一氧化氮之關係。Correa-Aragunde 等人 (2004)在番茄中發現生長素所誘導之側根形成需要透過一氧化氮之參與。而 Lombardo 等人 (2006)則首度發現在阿拉伯芥與萵苣中，生長素使得根毛數量增多與長度變長皆須透過一氧化氮之作用。本論文之試驗結果也發現在水稻黃化幼苗中，SNP (一氧化氮 donor)與 IBA (植物體中存在之生長素之一)可以誘導其種子根之側根與根毛的形成 (圖 1a-b、圖 2、圖 3、圖 5、圖 6)，且 IBA 所誘導之側根 (圖 7、圖 9a)及根毛 (圖 8)形成與一氧化氮的合成 (圖 11b)可以被一氧化氮清除劑 cPTIO 所抑制，而 SNP 與 IBA 所誘導之一氧化氮生成分布之位置與側根及根毛形成之位置相同 (圖 12、圖 13)，這些結果證實 IBA 所誘導水稻黃化幼苗側根與根毛形成之訊息傳遞過程中，需要一氧化氮的參與。

前人研究顯示高濃度之生長素會抑制根部之生長 (Kim and Mulkey, 1997)，在本論文之試驗結果中也發現處理高濃度之 IBA 時，種子根之長度會變短 (圖 1b)，Kim 和 Mulkey (1997)指出乙烯參與在生長素抑制根之生長之過程中，故我們也推測在本論文結果中發現之高濃度 IBA 所引起之根生長的抑制，可能是藉由產生乙烯所造成。

植物中合成一氧化氮之系統有兩個，分別為酵素反應系統與非酵素反應系統，而正常狀態下主要是經由酵素反應系統合成一氧化氮。前人研究發現在植物根中一氧化氮的合成可經由NOS (Hu *et al.*, 2005; Corpas *et al.*, 2006; Lombardo *et al.*, 2006)或NR (Hu *et al.*, 2005; Lombardo *et al.*, 2006; Graziano and Lamattina, 2007; Kolbert *et al.*, 2008)。本論文試驗結果發現在水稻黃化幼苗根中，NR的抑制劑Tu可以有效抑制IBA所誘導之一氧化氮生成 (圖11b)，而IBA所誘導之側根與根毛的形成也受到Tu所抑制 (圖7、圖8、圖10)，顯示在水稻黃化幼苗根中，IBA主要是

經由NR的作用合成一氧化氮，進而影響側根與根毛之形成。

本論文之試驗結果發現membrane-permeable之 $\text{Ca}^{2+}$ 螯合物BAPTA/AM與membrane-impermeable之 $\text{Ca}^{2+}$ 螯合物EGTA及BAPTA皆可有效抑制SNP與IBA所誘導之側根與根毛形成 (圖14、圖15)，顯示SNP與IBA之作用需要細胞間與細胞質中之 $\text{Ca}^{2+}$ 。而 $\text{Ca}^{2+}$ 通道阻礙劑 $\text{LaCl}_3$ 、verapamil與RR也可明顯抑制SNP與IBA所誘導之側根與根毛形成 (圖14、圖15)，顯示一氧化氮可透過調控根細胞中細胞質與細胞壁間之 $\text{Ca}^{2+}$ 運輸影響其作用。

而液泡與胞器中之 $\text{Ca}^{2+}$ 釋放到細胞質的過程受到 $\text{IP}_3$ 所調控 (Morse *et al.*, 1989; Allen *et al.*, 1995)。Shishova與Lindberg (2004)也提出生長素誘導細胞質中 $\text{Ca}^{2+}$ 之增加是透過 $\text{IP}_3$ 所調控之 $\text{Ca}^{2+}$ 通道蛋白，使得液泡中之 $\text{Ca}^{2+}$ 運送到細胞質中。本論文的結果也顯示 $\text{IP}_3$ 合成抑制劑LiCl與NEO可明顯抑制SNP與IBA所誘導之側根與根毛形成 (圖14、圖15)，說明SNP與IBA可經由透過 $\text{IP}_3$ 所調控之 $\text{Ca}^{2+}$ 通道蛋白影響其作用。

由於前面的結果說明 SNP 與 IBA 所誘導之水稻黃化幼苗側根與根毛形成需透過  $\text{Ca}^{2+}$  之參與，也發現其可能是藉由將細胞壁與胞器中之  $\text{Ca}^{2+}$  運送到細胞質中使得細胞質中之  $\text{Ca}^{2+}$  量增多，且  $\text{Ca}^{2+}$  螯合物與  $\text{Ca}^{2+}$  通道阻礙劑對 SNP 與 IBA 所誘導之一氧化氮生成並沒有影響 (圖 16)，顯示  $\text{Ca}^{2+}$  位於一氧化氮與 IBA 作用之下游。

Guo 等人 (2009)發現在番茄中 HO 所誘導之根毛形成需要透過一氧化氮之合成，然而，在本論文的試驗結果中發現在水稻黃化幼苗中 Hm 所誘導之側根與根毛形成 (圖 1c、圖 4、圖 5、圖 6)並沒有受到 cPTIO 所抑制 (圖 7、圖 8、圖 9b)，且 Hm 也無法誘導其生成一氧化氮 (圖 11a)，顯示 Hm 誘導側根與根毛之形成並不是透過一氧化氮的作用。

在人類白血球細胞中，處理 Hm 可以誘導 HO-1 蛋白質之表現 (Lang *et al.*, 2004)，此種差異可能與使用之物種不同有關。在本論文試驗結果中，也發現 Hm 確實可以使水稻黃化幼苗根細胞中之 HO 活性提升 (圖 17)，而 HO-1 之抑制劑 ZnPPiX (Noriega *et al.*, 2004)，也確實可以抑制 Hm 所誘導之 HO 活性上升 (圖 19) 及側根與根毛之形成 (圖 20、圖 21)。

在大豆葉片中發現 SNP 處理可以使得 HO-1 基因表現量提升 (Noriega *et al.*, 2007)，而本論文之試驗結果也顯示水稻黃化幼苗在 SNP 與 IBA 處理後，皆可使得其根部 HO 的活性提升 (圖 18)，而 ZnPPiX 也可明顯抑制由 SNP 與 IBA 所誘導之 HO 活性上升 (圖 19) 及側根與根毛之形成 (圖 20、圖 21)。這些結果說明 SNP、IBA 與 Hm 所誘導之水稻黃化幼苗側根與根毛之形成需要透過 HO 的參與。

HO 催化反應將 heme 分解產生一氧化碳、BV 與二價鐵離子。前人研究指出在番茄中一氧化碳可以促進根毛與側根之形成 (Guo *et al.*, 2009)，而一氧化碳與一氧化氮為生物體中兩個重要的氣態訊息分子。動物方面之研究也顯示一氧化氮與一氧化碳間之訊息傳遞是很重要的 (Hartsfield *et al.*, 2002)。本論文之試驗結果也發現 SNP、IBA 與 Hm 所誘導之水稻黃化幼苗側根與根毛之形成受到 Hb 的抑制 (圖 23、圖 24)，推測在水稻根中 SNP、IBA 與 Hm 之作用可能是透過 HO 之產物一氧化碳所引起。HO 催化之反應的另一個產物 BV 可促進水稻黃化幼苗側根與根毛形成 (圖 25、圖 26) 與 HO 活性 (圖 27)，此也說明 HO 對側根與根毛形成扮演重要之角色。

綜合上述之結果顯示水稻中，生長素可藉由圖 33 所示之途徑，調控側根與根毛之形成。

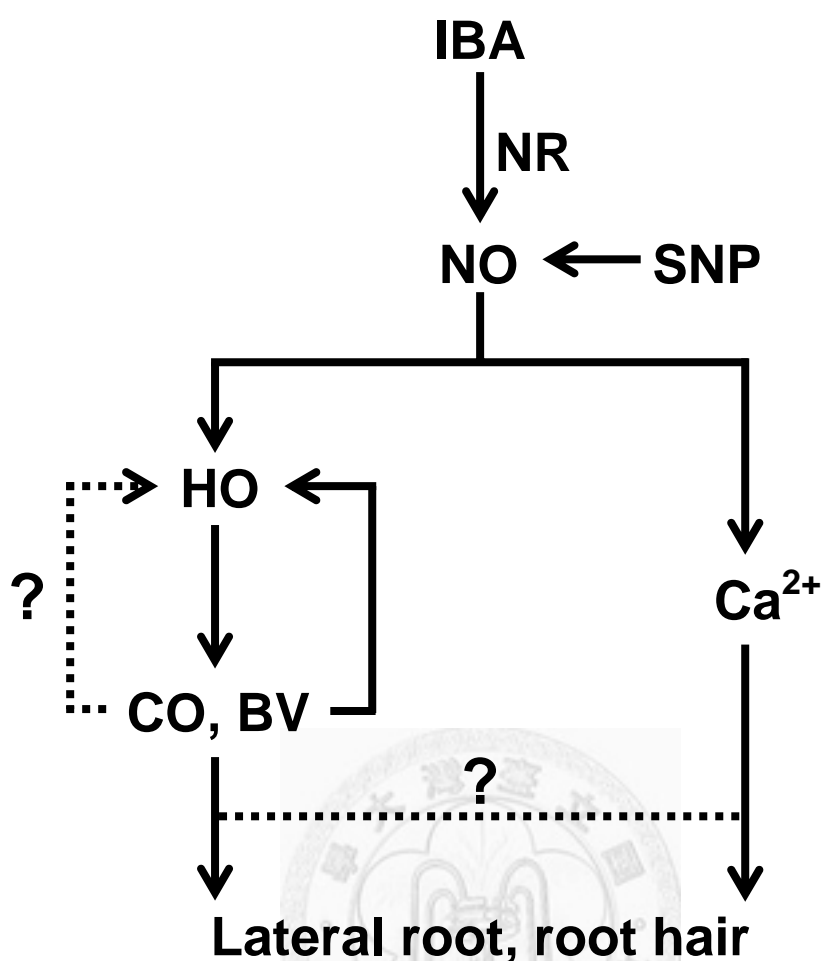


圖 33. 水稻幼苗根中生長素、一氧化氮與 HO 調控側根與根毛形成之機制。

動物中發現氧化逆境下 apocynin 處理會誘導一氧化氮的生成 (Riganti *et al.*, 2008)，而在玉米葉片中也發現 apocynin 誘導之一氧化氮生成可以幫助植株抵抗非生物性的氧化逆境 (Tossi *et al.*, 2009)。由於本論文前一個部分的結果顯示一氧化氮會促進水稻黃化幼苗側根與根毛之形成。故我們想瞭解 apocynin 在水稻中是否也會藉由誘導一氧化氮的合成進而促進側根形成，就水稻而言，apocynin 處理確實會誘導黃化幼苗側根形成 (圖 28)，但不會誘導一氧化氮的生成 (圖 29a)，且 cPTIO 無法抑制其誘導之側根形成 (圖 30)，說明 apocynin 所誘導之側根形成不是經由一氧化氮之作用。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 為活化氧族，濃度高時會對生物體造成氧化傷害，但當其濃度低時可以

做為訊息傳遞分子。Riganti 等人 (2006)發現 apocynin 處理會使得動物神經膠細胞  $\text{H}_2\text{O}_2$  濃度提高。而本論文也發現在水稻根中，apocynin 處理會誘導  $\text{H}_2\text{O}_2$  之生成 (圖 29b)，同時 apocynin 所誘導之側根形成受到  $\text{H}_2\text{O}_2$  合成抑制劑 DPI 所抑制 (圖 30)，單獨處理  $\text{H}_2\text{O}_2$  也可促進側根形成 (圖 31)，而且 apocynin 所誘導之  $\text{H}_2\text{O}_2$  生成分布之位置與側根形成之位置相同 (圖 32)，這些結果證實 apocynin 所誘導水稻黃化幼苗側根形成之訊息傳遞過程中，需要透過  $\text{H}_2\text{O}_2$  之作用 (圖 34)。

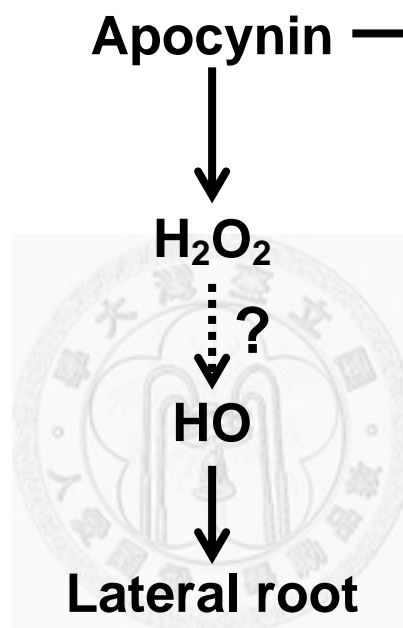


圖 34. 水稻幼苗根中 apocynin 調控側根形成之機制。

### 未來研究方向

本論文之試驗結果中一氧化氮需要透過  $\text{Ca}^{2+}$  與 HO 兩者之作用以影響水稻側根與根毛之形成，然而， $\text{Ca}^{2+}$  與 HO 間之作用仍尚待釐清。前人研究指出植物中一氧化氮與  $\text{H}_2\text{O}_2$  間之交互作用可以調控植物於逆境下之反應 (Rodriguez-Serrano *et al.*, 2009)，而本論文發現一氧化氮與  $\text{H}_2\text{O}_2$  皆可誘導側根之形成，因此在調控水稻黃化幼苗側根與根毛形成的調控途徑中，一氧化氮與  $\text{H}_2\text{O}_2$  間之關係仍可進一步探討。而初步研究結果顯示  $\text{H}_2\text{O}_2$  可能會使得 HO 的活性提升，但仍需進一步確認。

## 參考文獻

- Allen GJ, Muir SR, Sanders D** (1995) Release of  $\text{Ca}^{2+}$  from individual plant vacuoles by both InsP3 and cyclic ADP-ribose. *Science* **268**:735-737
- Aloni R** (1980) Role of auxin and sucrose in the differentiation of sieve and tracheary elements in plant tissue cultures. *Planta* **150**:255-263
- Aloni R, Aloni E, Langhans M, Ullrich CI** (2006) Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Ann Bot* **97**:883-893
- Arasimowicz M, Floryszak-Wieczorek J** (2007) Nitric oxide as a bioactive signaling molecule in plant stress responses. *Plant Sci* **172**:876-887
- Baker CJ, Mock NM** (1994) An improved method for monitoring cell death in cell suspension and leaf disc assays using evans blue. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* **39**: 7-12
- Besson-Bard A, Astier J, Rasul S, Wawer I, Dubreuil-Maurizi C, Jeandroz S, Wendehenne D** (2009) Current view of nitric oxide-responsive genes in plants. *Plant Sci* **177**:302-309
- Besson-Bard A, Pugin A, Wendehenne D** (2008) New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* **59**:21-39
- Blakely LM, Durham M, Evans TA, Blakely RM** (1982) Experimental studies on lateral root formation in radish seedling roots. I. General methods, developmental stages, and spontaneous formation of laterals. *Bot Gaz* **143**:341-352
- Bories PN, Bories C** (1995) Nitrate determination in biological fluids by an enzymatic one-step assay with nitrate reductase. *Clin Chem* **41**:904-907
- Bush DS** (1995) Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annual Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **46**:95-122
- Cai H, Griendling KK, Harrison DG** (2003) The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci* **24**:471-478
- Cao XY, Xuan W, Liu ZY, Li XN, Zhao N, Xu P, Wang Z, Guan RZ, ShenWB** (2007) Carbon monoxide promotes lateral root formation in rapeseed. *J Integr Plant Biol* **49**:1070-1079
- Casimiro I, Beckman T, Graham N, Bhalerao R, Zhang H, Casero P, Sandberg G, Bennett MJ** (2003) Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends Plant Sci* **8**:165-171
- Casimiro I, Marchant A, Bhalerao RP, Beeckman T, Dhooge S, Swarup R, Graham N, Inze D, Sandberg G, Casero PJ, Bennett M** (2001) Auxin

- transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell* **13**:843-52
- Catalá C, Rose JKC, Bennett AB** (2000) Auxin-regulated genes encoding cell wall-modifying proteins are expressed during early tomato fruit growth. *Plant Physiol* **122**:527-534
- Clementi E** (1998) Role of nitric oxide and its intracellular signaling pathways in the control of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis. *Biochem Pharmacol* **55**:713-718
- Corpas FJ, Barroso JB, Carras A, Valderranme R, Palma JM, Leon AM, Sandalio LM, del Rio LA** (2006) Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development. *Planta* **224**:246-254
- Correa-Aragunde N, Graziano M, Lamattina L** (2004) Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta* **218**:900-905
- Correa-Aragunde N, Graziano M, Chevallier C, Lamattina L** (2006) Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato. *J Exp Bot* **57**:581-588
- Cosgrove D** (1986) Biophysical control of plant cell growth. *Ann Rev Plant Physiol* **37**:377-405
- Cosgrove O, Hedrich R** (1991) Stretch-activated chloride, potassium, and calcium channels coexisting in plasma membranes of guard cells of *Vicia faba* L. *Planta* **186**:143-153
- Creus CM, Graziano M, Casanovas EM, Pereyra MA, Simontacchi M, Puntarulo S, Barassi CA, Lamattina L** (2005) Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato. *Planta* **221**:297-303
- Davis SJ, Bhoo SH, Durski AM, Walter JM, Vierstra RD** (2001) The heme-oxygenase family required for phytochrome chromophore biosynthesis is necessary for proper photomorphogenesis in higher plants. *Plant Physiol* **126**:656-9
- Davis SJ, Kurepa J, Vierstra RD** (1999) The *Arabidopsis thaliana* *HY1* locus, required for phytochrome-chromophore biosynthesis, encodes a protein related to heme oxygenases. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:6541-6546
- Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamd C** (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant defense resistance. *Nature* **394**:585-588
- Durner J, Wendehenne D, Klessig DF** (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP ribose. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:1032-1033
- Felle H** (1988) Auxin causes oscillations of cytosolic free calcium and pH in *Zea mays* coleoptiles. *Planta* **174**:495-499

- Forde BG, Lorenzo H** (2001) The nutritional control of root development. *Plant Soil* **232**:51-68
- Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H** (1994) Nitric oxide isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hyper* **23**:1121-1131
- Gehring C, Irving H, Parish R** (1990a) Effects of auxin and abscisic acid on cytosolic calcium and pH in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**:9645-9649
- Gehring C, Williams D, Cody S, Parish R** (1990b) Phototropism and geotropism in maize coleoptiles are spatially correlated with increases in cytosolic free calcium. *Nature* **345**:528-530
- Gilroy S, Jones R** (1993) Calmodulin stimulation of unidirectional calcium uptake by the endoplasmic reticulum of barley. *Planta* **190**:289-296
- Gouvêa, CMCP, Souza JF, Magalhães ACN, Martins IS** (1997) NO-releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Regul* **21**:183-187
- Graziano M, Lamattina L** (2007) Nitric oxide accumulation is required for molecular and physiological responses to iron deficiency in tomato roots. *Plant J* **52**:949-960
- Guardiola JL, Lázaro E** (1987) The effect of synthetic auxins on fruit growth and anatomical development in 'Satsuma' mandarin. *Sci Horti* **31**:119-130
- Guo K, Xia K, Yang XM** (2008) Regulation of tomato lateral root development by carbon monoxide and involvement in auxin and nitric oxide. *J Exp Bot* **59**:3443-3452
- Guo K, Kong WW, Yang ZM** (2009) Carbon monoxide promotes root hair development in tomato. *Plant Cell Environ* **32**:1033-1045
- Hao ZB, Ichii M** (1999) A mutant *RM09* of rice (*Oryza sativa* L.) exhibiting altered lateral root initiation and gravitropism. *Jpn J Crop Sci* **68**:245-252
- Hartsfield CL** (2002) Cross talk between carbon monoxide and nitric oxide. *Antioxid Redox Signal* **4**:301-307
- Hasnain S, Sabri AN** (1997) Growth stimulation of *Triticum aestivum* seedlings under Cr-stresses by non-rhizospheric pseudomonad strains. *Environ Pollut* **97**:265-273
- Hedrich R, Busch H, Raschke K** (1990)  $\text{Ca}^{2+}$  and nucleotide dependent regulation of voltage dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells. *EMBO* **9**:3889-3892
- Hu X, Neill SJ, Tang Z, Cai W** (2005) Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. *Plant Physiol* **137**:663-670
- Izawa T, Qjkawa T, Tokutomi S, Okuno K, Shimamoto K** (2000) Phytochrome

- confer the photoperiodic control of flowering in rice (a short-day plant). *Plant J* **22**:391-399
- Jackson WT** (1960) Effect of indoleacetic acid on rate of elongation of root hairs of *Agrostis alba* L. *Physiol Plant* **13**:36-45
- Jacobs WP** (1952) The role of auxin in differentiation of xylem around a wound. *Amer J Bot* **39**:301-309
- Johannes E, Brosnan J, Sanders O** (1992) Parallel pathways for intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release from the vacuole of higher plants. *Plant J* **2**:97-102
- Kim SY, Mulkey TJ** (1997) Effect of ethylene antagonist on auxin-induced inhibition of intact primary root elongation in maize (*Zea mays* L.). *J Plant Biol* **40**:256–260
- Knight M, Campbell A, Smith S, Trewavas A** (1991) Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature* **352**:524-526
- Knight M, Smith S, Trewavas A** (1992) Wind-induced plant motion immediately increases cytosolic calcium. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**:4967-4967
- Kolbert Z, Bartha B, Erdein L** (2008) Exogenous auxin-induced NO is nitrate reductase-associated in *Arabidopsis thaliana* root primordia. *J Plant Physiol* **165**:967-975
- Lamattina L, Garcia-Mata C, Graziano M, Pagnussat G** (2003) Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annu Rev Plant Biol* **54**:109-136.
- Lamotte O, Courtois C, Barnavon PA, Wendehenne D** (2005) Nitric oxide in plants: the biosynthesis and cell signaling properties of a fascinating molecule. *Planta* **221**:1-4
- Lanteri ML, Pagnussat GC, Lamattina L** (2006) Calcium and calcium-dependent protein kinases are involved in nitric oxide- and auxin-induced adventitious root formation in cucumber. *J Exp Bot* **57**:1341-1351
- Lee JS, Mulkey TJ, Evans ML** (1983) Gravity-induced polar transport of calcium across root tips of maize. *Plant Physiol* **73**:874-876
- Leo PD, Sacher JA** (1970) Control of ribonuclease and acid phosphatase by auxin and abscisic acid during senescence of *Rhoeo* leaf sections. *Plant Physiol* **46**:806-811
- Leshem YY, Wills RBH, Ku VVV** (1998) Evidence for the function of the free radical gas nitric oxide (NO) as an endogenous regulating factor in higher plants. *Plant Physiol Biochem* **36**:825-833
- Leyser HMO, Pickett FB, Dharmasiri S, Estelle M** (1996) Mutations in *AXR3* gene of *Arabidopsis* result in altered auxin responses including ectopic express of the *SAUR-ACI* promoter. *Plant J* **10**:403-414

- Lincoln E, Britton JH, Estelle M** (1990) Growth and development of the *axr1* mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2**:1071-1080
- Liu K, Xu S, Xuan W, Ling T, Cao Z, Huang B, Sun Y, Fang L, Liu Z, Zhao N, Shen W** (2007) Carbon monoxide counteracts the inhibition of seed germination and alleviates oxidative damage caused by salt stress in *Oryza sativa*. *Plant Sci* **172**: 544-555
- Lombardo MC, Graziano M, Polacco JC, Lamattina L** (2006) Nitric oxide functions as a positive regulator of root hair development. *Plant Signal Behav* **1**:28-33
- Mackerness SAH, John CF, Jordan B, Thomas B** (2001) Early signaling components in ultraviolet-B responses: distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide. *FEBS Lett* **489**:237-242
- Malamy JE** (2005) Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant Cell Environ* **28**:67-77
- Malamy JE, Ryan KS** (2001) Environmental regulation of lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **127**:899–909
- Masucci JD, Schiefelbein JW** (1994) The *rh6* mutation of *Arabidopsis thaliana* alters root hair initiation through an auxin and ethylene associated process. *Plant Physiol* **106**:1335-1346
- Mata GC and Lamattina L** (2001) Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiol* **126**:1196-1204
- Meyer JW, Schmitt ME** (2000) A central role for the endothelial NADPH oxidase in atherosclerosis. *FEBS Lett* **472**:1-4
- Morse MJ, Satter RL, Crain RC, Cote GG** (1989) Signal transduction and phosphatidylinositol turnover in plants. *Physiol Plant* **76**:118-121
- Muday GK** (2001) Auxins and tropisms. *J Plant Growth Regul* **20**:226-243
- Muday GK, Haworth P** (1994) Tomato root growth, gravitropism and lateral development: correlation with auxin transport. *Plant Physiol Biochem* **32**:193-203
- Muramoto T, Kochchi T, Yokota A, Hwang I, Goodman HM** (1999) The *Arabidopsis* photomorphogenic mutant *hyl* is deficient in phytochrome chromophore biosynthesis as a result of a mutation in a plastid heme oxygenase. *Plant Cell* **11**:3335-3348
- Muramoto T, Tsurui N, Terry MJ, Yokota A, Kochi T** (2002) Expression and biochemical properties of a ferredoxin-dependent heme oxygenase required to phytochrome chromophore synthesis. *Plant Physiol* **130**:11958-11966
- Nitsch JP** (1953) The physiology of fruit growth. *Ann Rev Plant Physiol* **4**:199-236
- Noh B, Bandyopadhyay A, Peer WA, Spalding EP, Murphy AS** (2003) Enhanced

gravi- and phototropism in plant *mdr* mutants mislocalizing the auxin efflux protein PIN1. *Nature* **423**:999-1002

**Noriega GO, Balestrasse KB, Battle A, Tomaro ML** (2004) Heme oxygenase exerts a protective role against oxidative stress in soybean leaves. *Biochem Biophys Res Commun* **323**:1003-1008

**Noriega GO, Yannarelli GG, Balestrasse KB, Battle A, Tomaro ML** (2007) The effect of nitric oxide on heme oxygenase gene expression in soybean leaves. *Planta* **226**:1155-1163

**Okada K and Shimura Y** (1994) Modulation of root growth by physical stimuli. In: Meyerowitz EM, Somerville CR, editors. *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press. p. 665-684

**Osborne DJ** (1959) Control of leaf senescence by auxins. *Nature* **183**:1459-1460

**Otterbein LE, Soares MP, Yamashita K, Bach FH** (2003) Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol* **24**:449-455

**Ötvös K, Pasternak TP, Miskolczi P, Dooki M, Dorjgotov D, Szcs A, Bottka S, Dudits D, Fehér A** (2005) Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of, cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures. *Plant J* **43**:849-860

**Pagnussat GC, Lanteri ML, Lamattina L** (2003) Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. *Plant Physiol* **132**:1-8

**Pagnussat GC, Simontacchi M, Puntarulo S, Lamattina L** (2002) Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiol* **129**:954-956

**Pasternak T, Rudas V, Potters G, Jansen MAK** (2005) Morphogenic effects of abiotic stress: reorientation of growth in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Environ Exp Bot* **53**:299-314

**Pedroso MC and Durzan DJ** (2000) Effect of different gravity environments on DNA fragmentation and cell death in *Kalanchoë* leaves. *Ann Bot* **86**:983-994

**Pedroso MC, Magalhaes JR, Durzan DJ** (2000) Nitric oxide induces cell death in *Taxus* cells. *Plant Sci* **157**:173-180

**Piantadosi CA** (2002) Biological chemistry of carbon monoxide. *Antioxid Redox Signal* **24**:259-24270

**Pickard BG, Thimann KV** (1964) Transport and distribution of auxin during tropistic response. II. The lateral migration of auxin in phototropism of coleoptiles. *Plant Physiol* **39**:341-350

- Rayle DL, Cleland RE** (1992) The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol* **99**:1271-1274
- Ridge RW, Katsumi M** (2002) Root hairs: hormones and tip molecules. In: Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U, editors. *Plant Roots: The Hidden Half*. 3rd ed. New York: Mercel Dekker, Inc., p.83-91
- Riganti C, Costamagna C, Bosia A, Ghigo D** (2006) The NADPH oxidase inhibitor apocynin (acetovanillone) induces oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* **212**:179-187
- Riganti C, Costamagna C, Doublier S, Miraglia E, Polimeni M, Bosia A, Ghigo D** (2008) The NADPH oxidase inhibitor apocynin induces nitric oxide synthesis via oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* **228**:277-285
- Robinson D** (1994) The responses of plants to non-uniform supplies of nutrients. *New Phytol* **127**:635-674
- Rodriguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, Pazmino DM, Testillano PS, Risueno MC, del Rio LA, Sandalio LM** (2009) Cellular response of pea plants to cadmium toxicity: cross talk between reactive oxygen species, nitric oxide, and calcium. *Plant Physiol* **150**:229-243
- Shacklock P, Read N, Trewavas A** (1992) Cytosolic free calcium mediates red light-induced photo morphogenesis. *Nature* **358**:753-755
- Shin R, Schachtman DP** (2004) Hydrogen peroxide mediates plant root cell response to nutrient deprivation. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 8827-8832
- Shishova M, Lindberg S** (2004) Auxin induces an increase of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in the cytosol of wheat leaf protoplasts. *Plant Physiol* **161**:937-945
- Takahashi H, Inoue Y** (2008) Stage-specific crosstalk between light, auxin, and ethylene during low-pH-induced root hair formation in lettuce (*Lactuca sativa* L.) seedlings. *Plant growth Regul* **56**:31-41
- Tanimoto M, Roberts K, Dolan L** (1995) Ethylene is a positive regulator of root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **8**:943-948
- Terry MJ, Linley PJ, Kohchi T** (2002) Making light of it: the role of plant haem oxygenases in phytochrome chromophore synthesis. *Biochem Soc Trans* **30**:604-609
- Thomas H, Stoddart JL** (1980) Leaf senescence. *Ann. Rev. Plant Physiol* **31**:83-111
- Torrey JG** (1950) The induction of lateral roots by indoleacetic acid and root decapitation. *Am J Bot* **37**:257-264
- Tossi V, Raúl C, Lamattina L** (2009) Apocynin-induced nitric oxide production confers antioxidant protection in maize leaves. *Plant Physiol* **166**:1336-1341

- Vejrazka M, Micek R, Stipek S** (2005) Apocynin inhibits NADPH oxidase in phagocytes but stimulates ROS production in non-phagocytic cells. *Biochim Biophys Acta* **1722**:143-147
- Wang H, Taketa S, Miyao A, Hirochika H, Ichii M** (2006) Isolation of a novel lateral-rootless mutant in rice (*Oryza sativa* L.) with reduced sensitivity to auxin. *Plant Sci* **170**:70-77
- Ward J, Schroeder J** (1994) Calcium-activated K<sup>+</sup> channels and calcium-induced calcium release by slow vacuolar ion channels in guard cell vacuoles implication in the control of stomatal closure. *Plant Cell* **6**:683-699
- Willmott N, Sethi JK, Walseth TF, Lee HC, White AM, Galione A** (1996) Nitric oxide-induced mobilization of intracellular calcium via the cyclic ADP-ribose signaling pathway. *J Biol Chem* **271**:3699-3705
- Wilson A, Pickett FB, Turner JC, Estelle M** (1990) A dominant mutation in *Arabidopsis* confers resistance to auxin, ethylene, and abscisic acid. *Mol Gen Genet* **222**:377-383
- Wilson ID, Neill SJ, Hancock JT** (2008) Nitric oxide synthesis and signaling in plants. *Plant Cell Environ* **31**:622-631
- Xiong J, Lu H, Lu K, Duan Y, An L, Zhu C** (2009) Cadmium decreases crown root number by decreasing endogenous nitric oxide, which is indispensable for crown root primordia initiation in rice seedlings. *Planta* **230**: 599-610
- Xu J, Xuan W, Huang BK, Zhou YH, Ling RF, Xu S, Shen WB** (2006) Carbon monoxide-induced adventitious root of hypocotyls cuttings from mung bean seedling. *Chin Sci Bull* **51**:668-674
- Xuan W, Zhu FY, Xu S, Huang BK, Ling TF, Qi JY, Ye MB, Shen WB** (2008) The heme oxygenase/ carbon monoxide system is involved in the auxin-induced cucumber adventitious root process. *Plant Physiol* **148**:881-893
- Yannarelli G, Noriega GO, Battle A, Tomaro ML** (2006) Heme oxygenase up-regulation in ultraviolet-B irradiated soybean plants involves reactive oxygen species. *Planta* **224**:1154-1162
- Zhang H, Forde BG** (1999) Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:6529-6534
- Zimmerman PW, Crocker W, Hitchcock AE** (1933) Initiation and stimulation of roots from exposure of plants to carbon monoxide gas. *Contrib Boyce Thompson Inst* **5**:1-17