

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

籼稻耐旱性之轉錄體分析

Transcriptome Analysis of Drought Tolerance in Indica

Rice by RNA-Seq

吳晶晶

Ching-Ching Wu

指導教授：邢禹依 博士 張孟基 博士

Advisor: Yue-Ie C. Hsing, Ph.D. Men-Chi Chang, Ph.D.

中華民國 103 年 7 月

July, 2014

謝辭



一路上所遇到的人事物讓我覺得我是個幸運的人，〈謝天〉裡從小時候就朗朗上口的經典名言，直到現在才有深刻的體會。在此藉由謝辭紀念，以感謝所有幫助並陪伴我到達此階段的人。

回首研究所的生活，發現自己獲得的不只是一本論文的完成，還有解決問題的能力與耐性，由衷要感謝的是邢禹依老師，除了悉心地指導研究方向更不吝分享人生經驗，讓我受益良多。在碩一仍對研究感到陌生的時期，感謝張孟基老師在實驗上的協助並且提供我們參考文獻閱讀。感謝林彥蓉老師與劉力瑜老師在百忙之中對這篇論文的細心審閱並提供許多寶貴的建議。感謝老師們在課程中傳授的知識，為本研究中不可或缺的基礎。本研究的材料提供要感謝吳永培博士的幫忙，另外感謝素貞學姊及實驗室成員的協助，讓我得以順利從嘉義收取材料。

正杰學長和尹姿不僅給予我實驗及分析上的指點，並且時常讓我在挫折後重新燃起動力，尤其感謝陪我南下收材料辛苦的尹姿。感謝小草學長在生物資訊上的指導與解惑，感謝宇安、樹民解決我在硬體方面的問題還有分析技術上的疑問。感謝小花學長、施明德學長總是能給予我精闢的建議，感謝紹安、凌姿、育鳴、嘉玲、藝瑋、玉英等學長姊在實驗上的幫助與平時的關心，還有吳阿姨的好廚藝總是讓我充滿元氣。兩年的時間經常面對課業與實驗進度雙重的壓力，多虧有R01的夥伴們一起加油打氣，讓我的研究所生活充滿歡笑。

感謝我的家人們，外婆的照顧，爸爸、媽媽不辭辛勞的工作，姊姊、妹妹及弟弟雖然吵鬧但仍互相幫忙分擔工作，讓我無後顧之憂的學習，並且給我持續往前的動力。也謝謝陪伴我的每一個人。

吳晶晶

2014.08 於臺北

摘要

耐旱機制是多數量性狀遺傳，受到不同基因型和環境的影響故不易探討，因此作物耐旱機制的完整探討須建立於生理與遺傳的整合性研究才能加速耐旱水稻的育成，而次世代定序的優點在於提供快速且全面性的轉錄體及代謝途徑概況，可初步提供資訊以進一步吻合前述的要求。

本研究利用 5 種對乾旱敏感程度不一的秈稻品系為材料，分別是 SM13、SM47 (兩者為疊氮化鈉誘變 IR64 所產生的耐旱突變系) 以及 IR64 (乾旱敏感)，再配合 HY15 及 TCN1 做為耐旱與敏感品種的對照。以 23.3% PEG 6000 模擬滲透壓-0.6 Mpa 的乾旱逆境，處理 3、24 小時以及處理 24 小時後回復 24 小時，萃取地上部 RNA 後利用 Illumina 平台進行 RNA-Seq，將基因表現量數據化後利用統計軟體篩選乾旱下顯著差異表現基因 (differentially expressed genes, DEGs)，接著利用基因本體 (gene ontology) 找出對乾旱顯著反應的基因功能。

結果顯示 DEGs 的功能會隨著乾旱處理時期以及基因型而改變，不同秈稻在乾旱初期的基因表現相似但 24 hr 及回復期則漸漸採取不同機制，特別是細胞溝通與細胞壁內的生理反應。而基因型間的差異以 SM47 較為明顯，SM47 獨特的耐旱相關基因功能包含訊息傳遞及碳水化合物代謝路徑等，另外為探討 IR64 與 SM47 在本質上的差異，嘗試以生資軟體分析兩者地上部轉錄體間的 SNP。

SM47 的生長勢及耐旱生理指標均顯示其具有耐旱特性，推測可能是由於滲透調節物質以及活化氧族清除者的生合成。這些存在不同基因型間的 DEGs 均有可能為耐旱候選基因，然而仍需要進一步的研究以驗證其功能。這些結果期望能提供乾旱反應的背景知識並加速耐旱水稻的育成。

關鍵字：秈稻、乾旱、次世代定序、轉錄體表現、代謝路徑分析

Abstract

Background: Drought tolerance mechanism is a complex trait that involves multiple genes and affected by genotypes and environments. Because improved methods of cultivation could not enhance yield efficiently, it is faster to conduct molecular breeding for drought tolerant rice to maintain a constant food supply. This research aims at building up background knowledge for drought tolerance mechanism in indica rice by transcriptome analysis.

Methods: The materials contained 5 types of indica rice which had different sensitivity to drought, including SM13 (highly drought tolerant), SM47 (moderate drought tolerant), IR64 (drought sensitive), HY15 (drought tolerant) and TCN1 (drought sensitive). SM13 and SM47 were sodium azide (NaN_3)-induced IR64 mutant lines. We conducted -0.6 Mpa drought treatments by PEG 6000 for 3 hr, 24 hr and recovery 24 hr (normal hydroponic solution after drought treatments for 24hr) when the materials reached three-leaf stage. Digitized gene expressions were calculated and differentially expressed genes (DEGs) were identified by CLC bio and DESeq, respectively.

Results: Gene ontology analysis suggested that some functions of DEGs were different among drought treatments and genotypes. The drought responses may be similar between 5 indica rice genotypes under early stage (3 hr) but different under 24hr and recovery. Drought related genes specific to SM47 involved in signaling transduction, carbohydrate metabolic process and other metabolic pathways. In addition, bioinformatics tool unravelled that SNP induced by NaN_3 existed in some SM47 transcripts.

Conclusions: SM47 seemed to be more drought tolerant than the others and had good growth potential. The ability of drought tolerance might be related to osmolytes



and ROS scavenger biosynthesis. The different DEGs between materials which had different sensitivity to drought were suggested to the candidate genes for drought tolerance. However, further research is needed to confirm their functions. The results could provide a genetic reference to accelerate the selection and breeding of drought tolerant rice.

Key words: Indica rice, drought, next generation sequencing, transcriptome, pathway analysis

目錄



謝辭	i
摘要	ii
Abstract	iii
目錄	v
表目錄	viii
圖目錄	ix
第一章、前言	1
第二章、前人研究	3
一、植物對乾旱的感知與訊息傳遞	3
1. 離層酸所調控的乾旱逆境反應	4
2. 非離層酸所調控的乾旱逆境反應	4
二、植物遭遇乾旱時的形態及生理代謝變化	5
三、植物的耐旱策略	6
1. 水稻已知的耐旱機制	7
2. 滲透調節機制	8
3. 抗氧化系統的活化	8
4. LEA 蛋白質在逆境中的功能	9
5. 賀爾蒙調控逆境機制	9
6. 疊氮化鈉 (NaN_3) 誘變對於作物耐旱性的改良	10
四、 次世代定序發展演進與優勢	11
1. 次世代定序及轉錄體研究起源	11
2. 生物資訊軟體的應用	12
3. SNP (Single nucleotide polymorphism) 的定位方式	13
五、 利用 IR64 突變庫篩選耐旱水稻	14

第三章、材料與方法.....	16
一、 水稻材料、生長環境與乾旱處理條件.....	16
二、 RNA 萃取與 Quantitative real-time PCR	16
三、 生物資訊分析軟體的應用.....	17
1. Illumina 定序與序列組裝 (assembly) 及註解 (annotation)....	17
2. 篩選差異表現基因及功能分析.....	18
3. SNP 定位分析	19
四、 水稻地上部總蛋白質的萃取及含量分析.....	20
五、 蛋白質單向電泳 SDS 聚丙烯醯胺膠體電泳分析 (SDS-PAGE).20	
第四章、結果.....	23
一、 五種秈稻在乾旱處理下之外表形態.....	23
二、 即時聚合酶連鎖反應 (Real-time PCR) 分析乾旱相關基因之表現量.....	23
三、 利用 RNA-Seq 分析乾旱敏感程度不同的秈稻轉錄體.....	24
1. Illumina 定序與基因組裝註解	24
2. 五種秈稻在乾旱逆境下的 DEGs 數量及基因表現趨勢分群..	25
3. 不同基因型秈稻在乾旱處理期及復水期的 DEGs 之共通性與差異.....	26
4. 耐旱突變系與 IR64 的轉錄體在乾旱處理前的差異.....	27
四、 以路徑分析不同基因型秈稻對於乾旱反應的差異.....	27
五、 IR64 與耐旱突變系在乾旱及復水處理下的蛋白質變化.....	28
一、 IR64 與耐旱突變系的地上部總蛋白之 SDS-PAGE 分析	28
二、 IR64 與耐旱突變系地上部之 LEA 蛋白質表現.....	29
六、 定位 SM47 中的突變基因.....	29
七、 水稻已知的耐旱相關基因表現.....	30
第五章、討論.....	31



一、 五種不同基因型的秈稻在乾旱下的轉錄體表現.....	31
1. 不同乾旱處理時期的整體反應.....	31
2. 不同基因型秈稻間的乾旱反應.....	33
二、 耐旱突變系與 IR64 的轉錄體存在本質的差異.....	34
三、 SM47 與 HY15 在乾旱下正向調控的 DEGs 可能為耐旱候選基因	
.....	35
四、 乾旱反應路徑富集分析.....	36
1. 乾旱反應相關代謝途徑.....	37
2. 耐旱相關代謝途徑.....	39
五、 IR64 與突變系的 LEA 蛋白質在乾旱下的轉錄體與蛋白質表現	
.....	42
六、 SM47 突變基因可能為耐旱候選基因.....	42
第六章、結論.....	44
參考文獻.....	83

表目錄



表 1、使用不同參考基因體與生資工具的序列比對 (mapping) 結果	45
表 2、RNA-Seq 序列片段以日本晴 mapping 的結果	46
表 3、SM47 與 HY15 在乾旱下正向調控的 DEGs	47
表 4、顯著正向與負向調控之 DEGs 參與之代謝路徑	51
表 5、SM47 的點突變分布情形	52
表 6、SM47 中候選突變基因的定位結果	53
表 7、TCN1 在乾旱下獨特負向調控的 DEGs	54
表 8、水稻已知耐旱相關基因	55

圖 目 錄

圖 1、耐旱水稻之功能基因體學研究與品種育成計畫.....	56
圖 2、五種秈稻在乾旱處理下之外表形態.....	57
圖 3、即時聚合酶連鎖反應 (Real-time PCR) 分析乾旱相關基因之表現量.....	58
圖 4、SM13、SM47、IR64、HY15 與 TCN1 中正向及負向調控之差異表現基因 (DEGs) 的數量變化.....	59
圖 5、4 種秈稻在乾旱下的 DEGs 表現量分群分析.....	60
圖 6、SM47 與 HY15 在乾旱下正向調控的 DEGs 之分群分析	61
圖 7、以 venn diagram 分析 SM47、IR64、HY15 與 TCN1 在乾旱處理下的 DEGs	62
圖 8、IR64 與耐旱突變系在正常情況下的轉錄體差異.....	63
圖 9、至少在任一種秈稻 (SM47、IR64、HY15 以及 TCN1) 中顯著正向調控之差異表現基因 (DEGs) 的數量與功能分析	64
圖 10、四種秈稻 (SM47、IR64、HY15 以及 TCN1) 中共通的正向調控差異表現基因 (DEGs) 的數量與功能分析	65
圖 11、四種秈稻 (SM47、IR64、HY15 以及 TCN1) 在不同乾旱處理時期下的顯著正向調控基因功能.....	66
圖 12、參與氮素代謝路徑的 DEGs 表現情形.....	67
圖 13、參與光合系統裡固碳作用的 DEGs 表現情形.....	68
圖 14、參與光合作用路徑的 DEGs 表現情形.....	69
圖 15、參與澱粉與蔗糖代謝路徑的 DEGs 表現情形.....	70
圖 16、參與乙醛酸及二羧酸代謝路徑的 DEGs 表現情形.....	71
圖 17、參與丙氨酸、天門冬氨酸以及麩氨酸代謝路徑的 DEGs 表現情形.....	72
圖 18、參與精氨酸及脯氨酸代謝路徑的 DEGs 表現情形.....	73
圖 19、參與糖解與糖質新生作用的 DEGs 表現情形.....	74
圖 20、參與植物賀爾蒙訊息傳遞路徑的 DEGs 表現情形.....	75
圖 21、參與五碳糖磷酸途徑的 DEGs 表現情形.....	76
圖 22、參與穀胱甘肽代謝路徑的 DEGs 表現情形.....	77
圖 23、參與過氧化體代謝路徑的 DEGs 表現情形.....	78
圖 24、參與類萜骨架生合成路徑的 DEGs 表現情形.....	79
圖 25、LEA 蛋白質在 IR64 種子與五種秈稻地上部中的轉錄體表現.....	80
圖 26、IR64 與其突變系地上部在逆境處理下之總蛋白的 SDS-PAGE 分析.....	81
圖 27、以 Western Blot 偵測 IR64 與其突變系地上部在逆境處理下之 LEA 蛋白質累積量.....	82

第一章、前言



稻 (*Oryza sativa* L.) 在 2011 年的總產量為 72 億公噸，是世界上穩定的作物之一 (FAO, Food and Agriculture Organization)，世界上一半以上的人口仰賴稻米作為主要的糧食來源，而水稻更是亞洲 30 億人口主要的食物，世界生產的稻米約 90% 為亞洲人所消費 (Li and Xu, 2007)。近年來隨氣候變遷，極端環境普遍導致作物產量損失約五成，第一次綠色革命及時拯救了 60 年代的糧食危機，然而現行農業技術對於產量的維持與提昇有限，仍跟不上人口數量暴增所產生的需求。當作物生存的環境惡化，食物的需求卻不減反增，我們該如何因應乾旱的威脅及人口的壓力並且兼顧生態保育永續經營？其實許多作物基因庫中仍有潛在的產量潛力尚未發揮到最大，因此篩選對環境耐受性高的基因型是十分重要的 (Boyer, 1982)。

然而耐旱稻的育成並不容易，看天田耐旱稻的培育效率主要由於 6 種困境無法提升：(1) 缺水抑制蒸散與光合作用，導致植物的生長與產量受限制。(2) 看天田作物的水分利用等因子在技術上難以測量，因此對於耐旱機制的了解仍不足。(3) 水分逆境改變土壤的養分環境，營養要素的有效性被抑制。(4) 在缺水逆境下，耐旱特性的重要性並不如物候 (phenology) 與產量性狀。(5) 基因型與環境的大量交感作用影響產量，產量的表現會隨環境浮動因此需要重複測試。(6) 乾旱不是一種穩定的現象，不同的乾旱形式需要不同的耐旱特性對應 (Fukai *et al.*, 1999)。由於乾旱的研究遭遇諸多困難，需要藉由團隊整合的研究方式加速耐旱水稻品種之選育，本研究即隸屬於耐旱水稻之功能基因體學研究與品種育成計畫。

計畫內容包含四個子計畫，分別為 (1) 分子標幟輔助耐旱水稻之選育 (2) 水稻耐旱基因之定位選殖與功能研究 (3) 耐旱水稻生理反應、機制和代謝產物之研究 (4) 以次世代定序進行轉錄體研究來探討水稻耐旱機制。子計畫一開發國內外耐旱稻之種原以解決耐旱種源的缺乏，子計畫二定位耐旱之 QTL 基因座

及運用分子輔助選種，子計畫三建構耐旱生理指標，本研究為子計畫四，篩選可能為耐旱候選基因之差異表現基因，提供轉錄體及乾旱代謝途徑概況以供其他計畫參考，期望藉由資訊的交叉整合加速國內耐旱水稻育種並調整旱稻栽培模式及策略。

本研究材料選擇乾旱逆境敏感的秈稻 IR64，以及農業試驗所嘉義分所的吳永培博士於 97 年二期作以疊氮化鈉 (NaN_3) 誘變 IR64 所產生高度耐旱突變系 SM13 及 SM47，再加上乾旱耐受性較佳的旱育 15 號 (HY15)，以及乾旱敏感的台中在來一號 (TCN1) 作為對照。以 23.3% PEG 6000 模擬滲透壓-0.6 Mpa 的乾旱逆境，處理 3、24 小時以及處理 24 小時後回復 24 小時，萃取地上部 RNA 利用 Illumina 平台進行 RNA-Seq。其中 IR64 與其突變系為遺傳背景相似的基因型，屏除品種間的差異以利幼苗期的耐旱轉錄體研究。基因表現量數據化後利用統計軟體篩選乾旱下顯著差異表現基因 (differentially expressed genes, DEGs)，接著進行基因本體 (Gene ontology, GO) 找出對乾旱顯著反應的基因功能，最後利用路徑富集分析整合受乾旱影響的代謝途徑。至於蛋白質層次則針對調節逆境生理反應的 LEA 蛋白質，萃取地上部全蛋白以 SDS-PAGE 及西方墨點轉漬法 (Western Blot) 分析。觀察隨逆境時間推移的轉錄體，我們可探討秈稻遭遇乾旱環境後旱期至晚期的反應機制，同時觀察基因型間對乾旱的不同反應，最後歸納出乾旱反應及耐旱機制中的調控路徑或是關鍵基因。

第二章、前人研究



植物處於乾旱逆境有兩種狀態，一種是根部吸收水量受到限制，另一種則是蒸散作用大過於吸收水分速度，兩者均會導致植物的生理功能失常。而自然界中根部吸收量不足可能是土壤乾涸，或是鹽分過高導致滲透壓增加形成生理乾旱 (Lisar *et al.*, 2012)。先前實驗發現普遍作物對於滲透壓的容忍範圍在 0.04 MPa 至 0.46 MPa 間 (Bridger and Alfrey, 1964)，而實驗室通常使用鹽類、甘露醇 (mannitol) 或是聚乙二醇 (polyethylene glycols, PEG) 营造滲透壓逆境。其中高分子量的 PEG (6000 Da 以上) 無法進入植物細胞孔隙，會直接導致細胞塌陷 (cytorrhysis) 而非質壁分離 (plasmolysis)。考慮小分子量溶質若被植物吸收可能影響生長，因此 PEG 的這項特性為模擬乾旱逆境之最佳溶質。

一、植物對乾旱的感知與訊息傳遞

由於不同部位傳導訊號的方式不盡相同，例如同一種訊息在氣孔與細胞擴張的反應就不同，因此高複雜度的感知機制仍具有爭議。不過仍有一些主要的媒介是明確的，首先是反應環境變化的分子機制，在訊息傳遞過程中受器會接收特定訊息並且產生 (或抑制) 基因或蛋白質之反應。最早發現在植物中的 osmosensor 是 *Arabidopsis thaliana* histidine kinase 1 (ATHK1)，這個 histidine kinase domain 被認為是感知滲透勢變化的受器並促使下游的訊號傳遞 (Urao *et al.*, 1999)。細胞質內的 Ca^{2+} 濃度變化是控制不同訊息傳遞路徑的重要樞紐，protein kinase 中的 Ca^{2+} dependent protein kinase (CDPK) 以及 mitogen activated protein kinase (MAPK) 被認為是植物在水分逆境下由膜傳向核的訊息傳遞因子 (Ramanjulu and Bartels, 2002)。另外植物在乾旱過程中，細胞膜與兩性離子的交互作用會導致膜構造的改變並釋放逆境訊息，接著會活化與滲透勢調節及離子平衡有關的 ABC transporter 以及 aquaporins (Chaves *et al.*, 2003)。上述兩基因的功能是經由離層酸調控途徑所影響的，觀察許多細胞至器官的乾旱反應也都是由離層酸調控

途徑或非離層酸調控途徑所控制，因此接下來將詳述其對於逆境調節的重要性。

1. 離層酸所調控的乾旱逆境反應

離層酸 (abscisic acid, ABA) 是植物在發育過程中的重要生長激素，也是遭遇逆境時促進生合成或抑制分解代謝的維生因子，會影響氣孔開關、種子休眠以及調控非生物逆境 (乾旱、鹽害及冷害) 的反應 (Davies, 2011; Himmelbach *et al.*, 2003; Peleg and Blumwald, 2011)。在逆境下會被離層酸誘導上升的基因包含很多群，有 LEA (late embryogenesis abundant) 蛋白質、酵素 (參與滲透調節因子的生合成、解毒及一般代謝)、運輸蛋白 (離子運輸蛋白、通道蛋白及 aquaporins) 以及調控因子 (轉錄因子、蛋白激酶及磷酸酶) 等 (Aryadeep *et al.*, 2013)。受離層酸誘導的基因啟動子區域具有 8 bp 保守性序列 (abscisic acid responsive element (ABRE), PyACGTGG/TC) 和 ACGT (Furihata *et al.*, 2006)。不過單拷貝 ABRE 並不足以應付離層酸所調控的轉錄反應，因此序列會重複並結合另一個 GC-rich 的序列 (coupling element, CE) 形成 abscisic acid responsive complex (ABRC)。在 1996 年的研究中，ABRC 存在大麥的 HVA22 (非典型 LEA 蛋白質) 以及 HVA1 (第三群 LEA 蛋白質)，是 ABA 調控基因表現途徑的重要啟動子 DNA 序列 (Shen *et al.*, 1996)。至於轉錄因子則有 bZIP、NAC 以及 MYC/MYB 家族參與離層酸與逆境的調控，其中 NAC 包含 no apical meristem (NAM)、ATAF1 和 2 以及 cup-shaped cotyledon 2 (CUC2) (Jeong *et al.*, 2010)。

2. 非離層酸所調控的乾旱逆境反應

利用缺乏離層酸與離層酸不敏感突變株的研究中，前人也發現到非生物逆境反應不全然是依賴離層酸的調節。此類基因，例如 responsive to dehydration 29A (RD29A) 及 cold-inducible1 (KIN1) 等，大多具有名為 Dehydration Responsive Element/cold-responsive element 或 C-repeat (DRE/CRT) 的順式作用元件 (cis-acting element)，並且不僅受到乾旱誘導，也與鹽害及冷害有關 (Kasuga *et al.*, 1999; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2000)。另外參與滲透逆境訊息傳遞的

APETALA2 (AP2) 型之轉錄因子 (dehydration-responsive element-binding protein, DREB) 也不受離層酸影響，其中 *DREB1A* 和 *DREB2A* 分別受到冷害以及乾旱、鹽害和熱逆境的誘導 (Aryadeep *et al.*, 2013)。*OsDREB2A* 也被證實會在乾旱及 250 mM 鹽逆境處理 24 小時表現，但僅輕微受離層酸與冷害影響 (Dubouzet *et al.*, 2003)。不過也有過量表現 *DREB2A* 的突變株卻無明顯的耐旱性，因此 *DREB2A* 蛋白質可能需要後轉錄修飾 (例如磷酸化) 活化才能發揮功能。由於仍有許多乾旱誘導基因不受冷害或離層酸影響，推測應該還有其他非離層酸所調控的路徑，例如 NAC 家族中的 *ERD1*，會受到自然或是黑暗刺激的衰老誘導 (Nakashima *et al.*, 1997)。

二、植物遭遇乾旱時的形態及生理代謝變化

乾旱對植物造成的影响可以由外觀形態與生理代謝機制觀察，形態跟生理調節是相輔相成的，許多作物為了減少水分散失而抑制葉片生長，產量也因為光合作用的減少而降低，另外氣孔關閉及根莖比也與 ABA 含量有關係。一般植物遭遇乾旱後會產生一些形態與生理的變化，例如氣孔關閉且數量減少、葉面積減少、細胞壁增厚、葉表面角質化、輸導組織發育不良、細胞膜損害、生物質量減少以及細胞的發育傾向增大而非分裂等等。至於生理代謝則包含能量供給、合成代謝、離子吸收及賀爾蒙生合成等途徑的改變，會影響碳水化合物、蛋白質、離子平衡 (ion homeostasis) 以及活性氧族 (reactive oxygen species, ROS) 累積。

首先是乾旱對於碳水化合物的影響，乾旱逆境導致植物 CO₂ 吸收量下降，光合作用由於原料供應不足而受到抑制，因此能量供給途徑以及碳水化合物生合成是對乾旱十分敏感的。當植物遭遇乾旱逆境初期，RuBisco 是光合作用中的影響生理功能的關鍵酵素，由於氣孔關閉導致作為碳源的 CO₂ 供給減少，因此 RuBisco 便快速分解補充碳源的不足。然而如此會造成葉綠素含量下降，光呼吸便緊接著增加以維持 RuBisco 的羧化功能，不過有別於葉綠素在乾旱下減少，有些參與葉黃素生合成的色素會增加，作為 ROS 的抑制劑。除了 RuBisco 還有其

他光合成酵素的活性會因乾旱下降，例如 NADP-dependent glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, phosphoenolpyruvate carboxylase, NAD-dependent malate dehydrogenase, phosphoribulos kinase, fructose-1,6- bisphosphatase 以及 sucrose phosphate synthase，電子傳遞鏈的效率降低也抑制了 ATPase 以及 NADP⁺的還原 (Lisar *et al.*, 2012)。另外許多研究指出植物葉片中的碳水化合物與可溶性醣類會受到乾旱影響，並且可能為代謝反應的傳遞因子 (Chaves *et al.*, 2003; Koch, 1996)。

乾旱會對植物的蛋白質生合成造成質與量的損害，而且一般而言生合成途徑被抑制的情形以 C3 較 C4 植物嚴重 (Lisar *et al.*, 2012)，在逆境後期有許多研究指出蛋白質會受到水分及滲透逆境影響 (Kawasaki *et al.*, 2001; Morillon and Chrispeels, 2001)。此外大多數逆境會導致氧化逆境的產生，因此乾旱也會促使活性氧族 (reactive oxygen species, ROS) 累積。乾旱下氣孔關閉限制 CO₂ 的進入量並且使 O₂ 濃度增高，因此卡爾文循環中的酵素 RuBisco 會與 O₂ 結合反應，此過程稱為光呼吸 (photorespiration)。其中電子傳遞鏈的過度還原是 ROS 產生的重要原因，只要植物處於逆境都會導致抗氧化能力的下降，因此乾旱也會引發氧化逆境的損害。ROS 包含超氧化物 (O₂[·], superoxide)、過氧化氫 (H₂O₂, hydrogen peroxide) 及羥基自由基 (OH[·], hydroxyl radicals) (Adler *et al.*, 1999)。

三、植物的耐旱策略

自從農業發展以來，乾旱是作物產量的主要限制因子，因此研究作物的耐旱機制一直是重要的課題。植物對乾旱的耐旱策略通常可以分為四種 (1) 逃旱性 (drought escape)：植物加快發育速度並在遭遇乾旱前完成生長週期；(2) 避旱性 (drought avoidance)：藉由降低氣孔導度及葉面積來調控蒸散與吸收水分速度；(3) 耐旱性 (drought tolerance)：藉由滲透調節物質 (osmolyte)，例如脯氨酸、甘氨酸及蔗糖，維持細胞膨壓以度過乾旱逆境 (IRRI, 1982) 以及 (4) 度過嚴苛乾旱的生存機制，不過第四個機制並不常見於農業作物中 (Tardieu, 2005)。逃旱性的實

際例子例如蕓苔屬 (*Brassica rapa* L.) 植物將開花期提早，而非提高水分利用效率來抵禦乾旱。避旱性則包含肉質植物與旱生植物的導管及沉水氣孔的數量較多，另外甜菜與白楊會增加根莖比以促進水分吸收 (Lisar *et al.*, 2012)。不過也有研究指出植物可能同時存在兩種耐旱機制，例如濕地草本多年生植物可利用避旱性及耐旱性機制調節生理功能度過乾旱 (Touchette *et al.*, 2007)。

1. 水稻已知的耐旱機制

關於水稻的耐旱研究除了針對逃旱性、避旱性以及耐旱性等植物普遍機制，還要再加上復原抗旱性 (drought recovery)，以觀察逆境解除後的生理機制能否恢復正常。耐旱機制除了要協助水稻在逆境下存活並且也要維持產量，策略通常包括 (1) 氣孔關閉減少水分散失：過量表現 *SNAC1* (*STRESS-RESPONSIVE NAC 1*) 之水稻轉殖株的乾旱鹽旱耐受性均較野生型 (WT) 為佳，主要是由於轉殖株的氣孔關閉數量較少以及對 ABA 的敏感度增加，不僅減緩水分流失速度，光合作用的效率也差異不大 (Hu *et al.*, 2006)。(2) 累積滲透調節物質維持細胞膨壓：dihydroorotate dehydrogenases (DHODHs) 為參與 pyrimidine nucleotides 生合成途徑的酵素，過量表現 *OsDHODH1* 轉殖株的相容質 (compatible solute 或 osmolytes) 與防禦性蛋白質增加，因此保護細胞度過乾旱及鹽害逆境 (Hadiarto and Tran, 2011)。(3) 賀爾蒙調節：*TLD1* 屬於調控初期 auxin 反應的 *Gretchen Hagen3 (GH3)* 基因家族，*TLD1* 功能獲得的水稻突變株，在乾旱情況下會誘導 indole-3-acetic acid (IAA)-amido synthetase 生合成，接著刺激 LEA (late embryogenesis abundant protein) 基因表現量上升，最後促使幼苗突變株的耐旱程度增加 (Zhang *et al.*, 2009)。(4) 抗氧化酵素清除 ROS： manganese superoxide dismutase (MnSOD) 之啟動子 *SWPA2* 轉殖水稻，顯示在乾旱逆境下的離子滲漏與傷害程度較輕微 (Wang *et al.*, 2005)。(5) 抗旱相關蛋白質生合成例如 LEA 和水通道蛋白 (aquaporin)：過量表現 *OsLEA3-1* 轉殖株具有較佳的乾旱耐受性並且不會造成產量的損失 (Xiao *et al.*, 2007)。另外過量表現水通道蛋白 *RWC3* 轉殖株在 10 小時 PEG 處理後，根部的

水利傳導係數 (hydraulic conductivity)、葉部水分潛勢以及相對累積蒸散量較高，顯示 RWC3 可能為水稻具有避旱性的重要關鍵 (Lian *et al.*, 2004)。(6) 抗旱相關功能基因表現上升：將耐旱稻品種 Nagina 22 的葉部及根部以 microarray 分析，發現一些轉錄因子表現量明顯上升，例如 WRKY、NAC、bZIP、Zinc finger 以及 MADS-box 蛋白質等 (Lenka *et al.*, 2011)。

2. 滲透調節機制

滲透調節機制可以維持細胞組織的代謝功能，並且讓植物在缺水逆境移除後也能重生，因此是植物適應乾旱的關鍵之一。雖然滲透調節需要達到特定的缺水標準才會啟動且速度通常很緩慢，並且會讓作物生長延遲影響產量，它仍然是植物根莖中維持水分利用的重要機制。滲透調節機制主要是利用相容質的累積降低細胞滲透勢，除了在乾旱下維持細胞膨壓也能保護細胞膜與生理功能，這些物質包含蛋白質與胺基酸 (脯胺酸、天冬胺酸及谷胺酸) (Samuel *et al.*, 2000)、四級銨鹽化合物 (glycine betaine 及 alanine betaine) (Rathinasabapathi *et al.*, 2001)、親水性蛋白質 (LEA 蛋白質)、碳水化合物 (聚果糖和蔗糖) (Vijn and Smeekens, 1999) 以及環醇 (松醇 D-pinitol) 和甘露醇 (mannitol) (Anderson and Kohorn, 2001; Chaves *et al.*, 2003)。

3. 抗氧化系統的活化

植物清除 ROS 的保護系統又稱為抗氧化系統，其中包括抗氧化酵素及非酵素型抗氧化劑，抗氧化酵素依功能分為對 ROS 直接作用以及保持抗氧化物質還原性，前者包含超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、過氧化氫酶 (catalases, CAT) 及過氧化物酶 (peroxidases, POD) 等，後者則為抗壞血酸過氧化物酶 (ascorbate peroxidases, APX)、穀胱甘肽過氧化酶 (glutathione reductase, GR) 以及單去氫抗壞血酸還原酶 (monodehydroascorbate reductase, MDAR) 等。非酵素型抗氧化劑則包含抗壞血酸 (ascorbate, ASA)、類胡蘿蔔素 (carotenoids) 及一些含硫基的低分子化合物，如還原型穀胱甘肽 (reduced glutathione, GSH) 等 (Lisar

et al., 2012; Mittler, 2002)。



4. LEA 蛋白質在逆境中的功能

LEA 蛋白質 (late embryogenesis abundant protein) 廣泛存在於許多維管束植物與非維管束植物中，不僅如此，在動物界例如脫水狀態下可存活的昆蟲中也被發現到 (Kikawada *et al.*, 2006)，因此可推測 LEA 蛋白質在演化過程中具有不可取代的保守性功能。先前的研究指出，當植物處於缺水的狀態會誘導親水性的 LEA 蛋白質結構折疊，形成保水的屏障並且降低離子強度，而復水時會轉變為維持細胞組件 (cellular component) 的角色，因此具有 osmoprotection 的重要功能 (Shih *et al.*, 2008)。目前 LEA 蛋白質主要分群的標準為蛋白質 domain 與化學特性 (Dure *et al.*, 1989)，其次為蛋白質序列的差異 (Wise, 2002)，種類基本上可以分為 5 群以上 (Ingram and Bartels, 1996; Zhang *et al.*, 2000)。LEA 基因與乾旱逆境的調控機制關係密切，由前人研究可知，早熟 (人工脫水)、外加 ABA 或是滲透調節物質 (polyethylene glycol、mannitol 等) 會誘導 LEA 蛋白質的生合成，協助原先無耐旱特性的種子度過乾旱逆境 (Bartels *et al.*, 1988; Blackman *et al.*, 1991; Hsing *et al.*, 1990; Hsing and Wu, 1992; Rosenberg and Rinne, 1989)。在兩種遺傳背景相似的豇豆品系 (F6 姊妹系) 中，耐冷品系的種子在浸潤過程 (imbibition) 中 35-kDa dehydrin 含量較多並且離子滲漏的速度較減緩 (Ismail *et al.*, 1997)。LEA 蛋白質不只在種子也會在營養組織中累積，外加 ABA 處理或是非生物逆境包含寒冷、乾旱和鹽害均會刺激其生合成。

5. 賀爾蒙調控逆境機制

大多數植物對於環境逆境的反應包括內生植物賀爾蒙的調節，例如作為環境訊息傳遞媒介的離層酸，由於參與調控植物在逆境下的生長發育，並且會受到乾旱誘導快速累積，因此又被稱為逆境賀爾蒙。篩選乾旱期間受到離層酸正向調控的基因進行啟動子分析，發現可以被離層酸活化的下游基因为 bZIP type AREB/ABF 轉錄因子，其中包括 LEA 家族和蛋白磷酸酶 2C (protein phosphatase

2C) (Yoshida *et al.*, 2010)。另外由於 *areb1 areb2 abf3* 突變株的耐旱性減弱並且對ABA 的敏感性降低，證實 AREB/ABFs 是調控離層酸乾旱反應相關基因的重要角色 (Yoshida *et al.*, 2010)。離層酸同時也與生長素 (auxin)、吉貝素 (gibberellin, GA) 與其他賀爾蒙的調控密切相關，在根尖不僅促進生長素運輸蛋白 AUX1 與 PIN2 的表現，並且活化離子幫浦以促進主根的延長與根毛的發育，增加度過中度乾旱的能力 (Xu *et al.*, 2013)。MYB96 (R2R3-type MYB 轉錄因子) 是 ABA 與 auxin 訊息傳遞路徑發生交感時的調控媒介，因此過量表現 MYB96 的突變株具有較少的側根及較強的耐旱性 (Seo *et al.*, 2009)。GID1 (GA-INSENSITIVE DWARF1) 是植物感知吉貝素 (Gibberellin, GA) 的受器，與賀爾蒙敏感脂肪酶相似，在 GA 訊息傳遞中 DELLA 蛋白質的降解是重要調控關鍵，DELLA 與 GID1 的交感作用是 GA 反應的負向調控因子 (Hirano *et al.*, 2008)。特別的是 DELLA 蛋白質作為調控的樞紐 (hub)，整合植物在不同環境下內生荷爾蒙的調控。

6. 疊氮化鈉 (NaN_3) 誘變對於作物耐旱性的改良

化學誘變劑能夠誘導對環境敏感的作物產生耐受性，並且增加作物產量及提升品質，因此近年來逐漸成為改良作物的重要工具。許多種子繁殖的作物如大麥、水稻和小麥等均利用突變成功地得到理想的性狀，然而突變造成染色體的隨機變化也可能是負向的損害。前人研究認為疊氮化鈉是最有效率且方便使用的化學誘變劑，相較於其他物理或化學誘變劑，它的優點在於誘導染色體突變的程度較輕微 (Olsen *et al.*, 1993)。疊氮化鈉的誘變原理在於無機疊氮化物 (N^{3-}) 會置換掉自然界中的硫化物 (S^{2-}) 合成有機氮化物，而此化合物會進入細胞核內與 DNA 作用，並造成基因體上的點突變 (Owais and Kleinhofs, 1988)。另外疊氮化鈉游離成疊氮酸才能穿透細胞膜導致誘變，研究得知同濃度的疊氮化鈉在 $\text{pH} = 3$ 的游離程度為 $\text{pH} = 6$ 的 19 倍，因此疊氮化鈉在低 pH 值的環境下誘變效果較佳 (Olsen *et al.*, 1993)。點突變包含兩種類型：轉換 (transition) 及顛換 (transversion)，轉換是由嘌呤置換嘌呤或嘧啶置換嘧啶；顛換是指嘌呤與嘧啶間的置換。前人在

疊氮化鈉誘變大麥的研究中，觀察到所有點突變裡有 86% 為轉換導致，並且以 A · T → G · C 的頻率較高（為 G · C → A · T 的三倍），因此推論疊氮化鈉誘變點突變的形式有偏好性 (Olsen *et al.*, 1993)。目前提升作物產量與品質的主要方法為利用雜交增加其對環境的耐受性，然而作物育種家常遇到的困難在於基因庫中抗性資源的限制，因此能夠增加種源變異的化學誘變處理是十分有助於作物育種的。其中疊氮化鈉具有方便性、低成本與較佳的點突變辨識度，為廣泛使用的化學誘變劑。

四、 次世代定序發展演進與優勢

1. 次世代定序及轉錄體研究起源

由於水稻在糧食作物中的重要地位，且基因組在禾本科作物中較小，促使 1990 年開始進行國際水稻基因體定序計畫，成為第一個定序完成的作物 (IRGSP, 2005)。目前由於高通量資訊技術的發展，快速且全面性的基因功能與生理機制研究，促使遺傳育種累積大量成果，例如開發重要農藝性狀的分子標誌、遺傳圖譜以及研究禾本科作物物種間基因組的共線性關係，因此水稻成為作物研究上的模式植物。

目前廣泛應用的高通量基因表達分析技術，常用者有 DNA 微陣列分析 (DNA microarray analysis) 及次世代定序 (next generation sequencing, NGS) 為基礎的 RNA-Seq (Delseny *et al.*, 2010)。兩者主要的優勢在於能同時大量地、全面性地偵測上萬個基因表現量。高密度微陣列分析發展於 1990 年，技術相較於次世代定序成熟且較能掌控技術性的誤差。然而由於微陣列分析中大部分探針的設計是基於已註解的基因，且其註解的表現序列標幟 (expressed sequence tag, EST) 與全長 cDNA (FL-cDNA) 無法涵蓋整個轉錄區域。此外微陣列分析受限於雜合背景的資料庫，只有少部分基因可被偵測且有時無法表達基因的完整結構如選擇性剪接等。至於 RNA-seq 是將核酸短片段化後進行的高通量定序分析，即便是序列未完全解碼的物種亦可使用此方法偵測基因表現量，不過需要藉由統計軟體

量化與註解轉錄體。其對於基因表現量的靈敏度及偵測範圍均優於 microarray，另外也可以偵測出剪接變異型 (splice variants) 與未知基因 (Nookaew *et al.*, 2012)，目前次世代定序 RNA-Seq 技術可以彌補微陣列分析之限制。



2. 生物資訊軟體的應用

CLC Genomics Workbench (CLC Bio) (CLC Inc, Aarhus, Denmark) 是一套分析次世代定序資料的軟體，分析包含 DNA、RNA 以及蛋白質層次的資訊，並且支援多種定序平台的原始資料，轉錄體原始資料從序列組裝、註解到基因表現量分析都可以在軟體內完成。CLC Bio 不僅整合目前研究領域所需要的分析方式，且其圖形介面方便不具備特殊電腦技能的研究者輕易操作。

R 是一個不僅提供統計分析並且具有強大繪圖功能的免費軟體，透過完善的論壇資源交流，可以即時修改程式以符合實驗需求。其中 Bioconductor project 最早是由 Fred Hutchinson 癌症研究中心發起的計畫，目的主要是研發基因體資料的分析工具，並且每年會更新兩次版本以追上瞬息萬變的體學研究。因此轉錄體研究主要可藉由 R 軟體繪製高品質的圖表解讀整合高通量資料，例如 gplots 套件 (Warnes *et al.*, 2014) 中有許多圖表選項，另外採用它的統計模型分析來篩選差異表現基因 (differentially expressed genes, DEG) 找出調控的關鍵。

差異表現基因顧名思義是轉錄體表現量會隨不同樣品條件而改變的基因，其功能可能扮演逆境調控的關鍵角色。差異程度的多寡可用兩樣品的標準化基因表現量 (如 reads per kilobase per million mapped reads, RPKM)¹ 比例界定，通常以 fold change² 或是 log fold change 表示，不過以能表現 k 與 $1/k$ 同等重要性的 log

¹ RPKM (reads per kilobase per million mapped reads)：是一種校正基因表現量的計算方法，由於序列較長的基因被抽樣的機率高於序列較短者，因此短序列基因的表現量容易被低估。使用 RPKM 處理定序資料可以得到較準確的基因表現量。RPKM 的算式如下： $RPKM = \frac{\text{total exon reads}}{\text{mapped reads (millions)}} \times \frac{\text{exon length (KB)}}{\text{total exon reads/mapped reads (millions)}}$ 表示在所有 read 中 map 到該基因之比例，再除以代表基因長度的 exon length (KB)。

² fold change：在某種狀態變化下，將初期至最終的改變量化所得到的數值。

為佳 (Bengtsson *et al.*, 2001), 顯著基準則為隨意設定。至於 R 軟體的 Bioconductor project 中有許多套件是基於統計方法來篩選 DEG, 其中 DESeq 套件 (Anders and Huber, 2010) 是普遍用於次世代定序的分析工具，輸入的資料為兩種欲比對之 library 的序列片段數量 (read count)，前人研究發現 read count 與轉錄體的表現量呈現將近線性的相關 (Mortazavi *et al.*, 2008)。當實驗重複不足無法計算變異時，RPKM 與 DESeq 均可模擬生物樣品間的變異性，不過由於 DESeq 的演算基於負二項分布 (negative binomial distribution)，因此 p-value 的可信度較準確 (Garber *et al.*, 2011)。

GO 普遍應用在功能註解，其中 agriGO 是一種專門為農作物研發的線上分析工具 (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/analysis.php>)，它提供四種不同分析方法，包含 SEA (singular enrichment analysis)、PAGE (parametric Analysis of Gene set Enrichment)、BLAST4ID (transfer IDs by BLAST) 以及 SEACOMPARE (Cross comparison of SEA)。SEA 是最為廣泛應用的，僅需要輸入目標基因名稱列表，採用多重檢定並設定 false discovery rate (FDR) 標準來篩選顯著差異的基因功能。Pathway tools analysis 整合許多模式物種的代謝過程與基因體資料庫 (Pathway/Genome Database, PGDB)，超過 800 個特定物種的 PGDB 透過世界各地科學家建構交流，豐富的背景資源不僅提供代謝網絡的預測，也串聯不同物種間的比較生物學研究 (Karp *et al.*, 2010)。

3. SNP (Single nucleotide polymorphism)的定位方式

利用上述生物資訊工具可以觀察品種間基因表現量的差異，然而偵測基因序列的改變才是影響耐旱程度的關鍵。SNP (single nucleotide polymorphism) 又稱為單一核苷酸多型性，意思是 DNA 序列中單一鹼基對 (A, T, C, G) 的改變，造成物種之間基因組的多樣性。由前述可知疊氮化鈉會誘變基因體產生點突變，因此便能導致 SNP 的發生。偵測疊氮化鈉產生之 SNP 的傳統方式有 polymerase chain reaction (PCR) 與 non polymerase chain reaction (non-PCR) 兩種，接下來主要會

介紹以序列比對並註解 SNP 的工具—SnpEff。SnpEff 的使用流程包含兩部分：建立資料庫和效應計算，建立資料庫需要參考基因體的 FASTA 檔案，以及通常為 GTF 或 GFF 的註解檔案，目前網路上已可取得許多含有註解的資料庫；在資料庫下載完成後才可進行效應計算，載入的檔案通常為 VCF 格式。接著預測每個變異鹼基所呈現的意義，輸出結果會包含所有比對到的註解區域，不管此區域是否含有 exon (Cingolani *et al.*, 2012)。SnpEff 的流程概念就是比對樣品序列與參考基因體後，定位並註解 SNP 對於編碼的影響。

五、利用 IR64 突變庫篩選耐旱水稻

研究遺傳背景相似的突變品系可降低因品種間差異造成的複雜度，因此農業試驗所嘉義分所吳永培博士於 97 年二期作以疊氮化鈉 (NaN_3) 誘變籼稻品種 (*Oryza sativa* L. cv. IR64) (吳, 2013)，首次使用濃度為 2 mM 的 NaN_3 ，產生 3000 株 M_1 族群，自交成熟後每單株收取單穗再取 2 粒種混合成 M_2 ，3000 株 M_2 族群同樣收取單穗 2 粒混合待二度誘變。第二次進行濃度為 1.5 mM 的 NaN_3 誘變，依照前次操作方式收取種子培育 8000 株 M_1 及 2500 株 M_2 族群，至 M_3 種子開始進行幼苗期之乾旱耐受性篩選，以旱育 15 號為耐旱品種對照，而 TCS17 為敏感品種對照。調查標準採用國際水稻研究所對於乾旱敏感度 (drought sensitivity) 的分級，包括營養生殖期之葉片捲曲與乾枯程度，從輕微至嚴重分為 0、1、3、5、7、9 等級，更準確區別幼苗間對於乾旱反應的差異 (IRRI, 1980)。

種子播入水耕盤時以 0.5 倍木村氏 B 水耕液配方 (Yoshida *et al.*, 1976) 培養，待材料生長至 1 葉齡後更換為 1 倍，3 葉齡時則更換為 1.5 倍。培育至 14 天 (約 3 至 4 葉齡) 更換含有 20% 聚乙二醇 (PEG 6000) 的水耕液，處理逆境 12 小時開始調查耐旱等級直到 96 小時。藉由外觀形態調查可發現，當逆境處理 3 天時耐旱品種的耐旱等級均在 3 至 5 級間，而敏感品種則達到 7 級，於此時仔細沖洗植株根部以不含 PEG 6000 水耕液培養 (復水) 則大部分耐旱品種恢復良好。接著以 0.5 倍水耕液培育 7 天，將存活之 152 株 M_3 耐旱苗以單本植方式移植於田間，

同樣待自交成熟後單株收穫 M₄ 種子，最後產生 126 個 M₄ 品系繼續進行乾旱耐受性的確認。接著施加更嚴重的乾旱逆境 (28% PEG 6000)，M₄ 突變系繼續純化繁殖達 M₆ 世代，從 M₆ 世代篩選出 9 個耐旱等級表現為 3 級的突變品系：SM13、SM36、SM47、SM66、SM72、SM100、SM103、SM117 以及 SM130。

前人針對 IR64 與其中兩個突變系 (SM13 與 SM47) 研究耐旱指標，另外加上由山地陸稻引進耐旱性狀的旱育 15 號 (HY15) 與台灣普遍種植的台中在來一號 (TCN1) 作為對照 (王等，2013)，分析幼苗期在 23.3% PEG 6000 下的耐旱性狀差異。測試項目包含乾旱敏感度、乾旱存活率 (survival rate)、光合作用效率 (Fv/Fn)、超氧歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性、脂質過氧化作用 (MDA)、脯胺酸 (proline) 累積以及相對水分含量 (relative water content, RWC) 等乾旱生理反應。結果顯示當逆境處理 36 小時前，耐旱突變系與 HY15 的乾旱敏感度均低於其他品種，存活率也以突變系表現為佳，外觀之耐旱程度由強至弱排序大概為 SM13、SM47、Huhan15、IR64 最後是 TCN1。接著觀察 IR64 與其突變系的差異，生理指標中的負向耐受指數 (H₂O₂ 及 MDA 含量) 以 IR64 累積較多，而正向耐受指數 (Fv/Fn、脯胺酸含量、SOD 活性及 RWC) 均以突變系表現較佳。因此突變系藉由累積滲透壓調節物質以及抗氧化酵素增加對於乾旱的耐受性。

第三章、材料與方法



一、水稻材料、生長環境與乾旱處理條件

本實驗挑選乾旱敏感的 IR64 與其耐旱突變系 SM13 及 SM47 為實驗材料，另外以 HY15 為耐旱品種而 TCN1 為敏感品種作為對照。水稻種子以 1% (w/w) NaOCl 加入一滴 Tween 20 消毒 15 分鐘後，在 37°C 避光環境下浸於逆滲透 (Reverse Osmosis, RO) 水中催芽。約兩天後移至六十孔盤之網架，在注入 pH 4.7 至 4.8 間之木村式水耕液 (附錄 1) 的盆子中種植約 14 天達到三葉齡時期。全程皆種植於人工氣候室 (101 年 7 月)，採用自然光且溫度控制在日溫 30°C±1 及夜溫 25°C±1。至於乾旱處理則是以 23.3% PEG 6000 模擬滲透壓 -0.6 Mpa 的乾旱逆境，將三葉齡水稻處理 3 小時 (3 hr)、24 小時 (24 hr) 以及處理 24 小時後回復 24 小時 (R 24 hr)，收取控制組 (0 hr) 及各處理組之地上部並進行三重複，所有樣品均立即冷凍於液態氮並保存在 -80°C 冰箱中以供 RNA-Seq 使用。而蛋白質分析以及外觀形態攝影則使用種植於嘉義農試分所 (102 年 7 月) 及中央研究院溫室 (103 年 4 至 6 月間) 的材料。嘉義農試分所的植株種植於塑膠盆之網架上，中央研究院溫室則是每 50 粒種子置於一燒杯，其餘處理方式均與上述相同。

二、RNA 萃取與 Quantitative real-time PCR

總核糖核酸 (total RNA) 的萃取是依照 Trizol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A) 的實驗流程手冊進行。取約 0.1 g 地上部以液態氮研磨成細緻粉末後加入 1 ml Trizol® Reagent 震盪均勻，置於冰上 5 分鐘後在 4°C 下以 13,000 rpm 離心 15 分鐘。取上清液加入 200 µl Chloroform (Trizol:Chloroform=5:1)，震盪後再次離心 15 分鐘。取 400 µl 上清液於 1.5 ml 離心管中再加入 400 µl isopropryl alcohol (兩者比例為 1:1)，混和均勻置於冰上 10 分鐘。接著 4°C 下以 13,000 rpm 離心 10 分鐘後可看到 RNA 沉澱，移除上清液並加入 1 ml 75% 酒精 (以 DEPC 水配製) 清洗。4°C 下以 8,000 rpm 離心 5 分鐘後移除上清液 (重複此步驟一次)，風乾 5 至 10 分鐘直到 pellet 呈透明，加入適量 Nuclease-free water 並輕彈離心管

使 pallet 回溶, 於室溫下放置 5 到 10 分鐘。最後取 1 μ l RNA 加入 99 μ l 10 mM pH 8.0 的 Tris buffer 以分光光度計測量其吸光值。

接著跑膠觀察 RNA 的品質是否完整, 配製 1% agarose gel (溶於 BTPE buffer (10 mM PIPES、30 mM Bis-Tris 及 0.1 mM EDTA, pH 6.5))，取 1 μ l RNA sample 加入 5 μ l glyoxal reaction mixture (60% DMSO、1.2 M glyoxal、1.2X BTPE buffer、4.8% glycerol 及 0.2 mg/ml EtBr)，混和均勻以 65°C 反應 15 分鐘使 RNA 變性。反應完立即置於冰上，使用 BTPE buffer 為電泳緩衝液，設定 100 Volt 跑 15 分鐘後即可放入儀器照膠。RNA 萃取後利用 TURBO DNA-freeTM kit (AM1907, Ambion, Austin, TX, U.S.A) 去除殘存 DNA，合成 1st cDNA (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A)。接著依照 KAPA SYBR[®] FAST qPCR Kit (Kapa Biosystems, Woburn, MA) 流程，將 1st cDNA 加入 PCR reaction mixture (含 SYBR Master Mix 與目標基因引子對)進行即時定量聚合酶鏈鎖反應 (Quantitative real-time PCR, Q-PCR)。Real-time PCR 利用 PCR 擴增的原理，將微量的 DNA 放大並以螢光染劑標記，產物再經由光學儀器即時偵測，當 DNA 樣品的濃度愈高，其螢光值愈早達到偵測之閥值 (Threshold)。儀器輸出的原始資料為反應的循環數 (cycle)，又稱為 Ct 值，目標基因需要利用內部對照基因的 Ct 值校正後才能得到相對基因表現量。Q-PCR 分析之乾旱相關基因如下：*OsDREB2A* 以及 *OsNAC6*，另外選擇調控細胞骨架的 formin protein 作為內部對照 (internal control)，引子序列標註於附錄 2。最後在進行定序前，總 RNA 需要至少 15 μ g 且濃度需大於 300 ng/ μ l，另外品質須符合 260/280 為 1.9 至 2.1 且 $260/230 > 1.7$ ，RQI (RNA Quality Indicator) ≥ 8 。

三、 生物資訊分析軟體的應用

1. Illumina 定序與序列組裝 (assembly) 及註解 (annotation)

高品質 RNA 經由有勁生物科技有限公司製備 cDNA 資料庫並使用 Illumina HiSeq 2000 定序平台，以雙端定序 (paired-end) 產生約 20 M 的資料量且序列片段 (reads) 長度為 101 bp，插入長度 (insert size) 的範圍為 250 至 350 bp。所有

原始 reads 在定序後均經由 FastQC 軟體分析品質，包含序列鹼基偏好性、GC 含量以及 Q 值 ($Q = -10 \log_{10} p\text{-value}$) 等。為了比較不同參考基因體與組裝工具的序列比對 (mapping) 結果，使用 MSU rice 7.0 版本 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)、9311 (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*) 以及 RAP-DB (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*) 的 IRGSP-1.0 (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>) 作為參考基因體。組裝工具則包含 CLC Genomics Workbench version 4.9 (CLC Bio) (CLC Inc, Aarhus, Denmark)，基因序列組裝及註解利用 CLC Bio 以及 TopHat 進行。設定 mapping 條件包括非專一的 read 數要低於 10，錯誤的鹼基要低於 2 個，接著以 RPKM (Reads Per Kilobase per Million mapped reads) 將基因表現量標準化，公式為 $\text{total exon reads} / \text{mapped reads (millions)} \times \text{exon length (KB)}$ (Mortazavi *et al.*, 2008)。

2. 篩選差異表現基因及功能分析

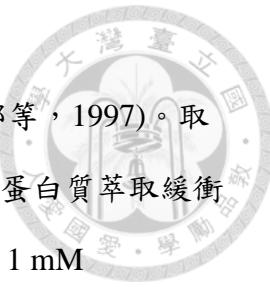
由於樣品資料無重複，因此不同樣品間 DEGs 篩選的方式主要是利用 R 軟體 3.0.1 版本 Bioconductor project 中的 DESeq (Anders and Huber, 2010)，以模擬生物樣品間的變異性。輸入的資料為兩種欲比對之樣品的序列片段數量 (read count)，read count 是定序原始資料與參考水稻基因體比對後所得到 (利用 CLC Bio 進行)，並設定 $p\text{-value} \leq 0.05$ 為顯著標準。另外計算這些 DEGs 的表現量 RPKM，將這些基因在不同樣品中的 RPKM 相加，藉由篩選加總高於 20 以上去除低表現量的基因。

後續利用生物資訊軟體針對 DEGs 進一步分析如下：(1) 功能註解：利用 agriGO (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/analysis.php>) 進行基因本體分析，在線上輸入目標基因名稱列表，並設定 $FDR \leq 0.05$ 為顯著差異的功能， FDR (False Discovery Rate) 為校正過的 $p\text{-value}$ 。(2) 觀察乾旱相關基因的變化：利用 heatmap 及折線圖兩種方式分析基因表現趨勢。Heatmap 的分析可以利用 MeV 軟體操作 (Saeed *et al.*, 2003)，另外也可以利用 R 軟體套件 gplots 中的 heatmap.2 (Warnes *et*

al., 2014), 其預設分群演算法是基於歐幾里得距離 (euclidean distance) 及平均連結聚合演算法 (average-linkage agglomerative algorithm) 分析；而折線圖型式則利用 Short Time-series Expression Miner (STEM) 軟體操作 (Ernst and Bar-Joseph, 2006)。(3) 路徑分析 (pathway analysis)：下載 Pathway tools analysis version 13.0 桌機板 (Karp *et al.*, 2010)，並且依照操作手冊指示載入水稻資料庫，若無法下載則至 Gramene 手動下載 RiceCyc ver 3.3 (<ftp://ftp.gramene.org/pub/gramene/pathways/ricecyc/>)。同品種內挑選乾旱處理比控制組為 \log_2 fold change ≥ 1 的 DEGs，輸入資料包含目標基因名稱及表現量列表，可選擇觀察單一逆境下的基因表現或是表現量隨逆境時間而改變的動畫。KOBAS 2.0 是基於多種資料庫 (例如 KEGG PATHWAY、PID、BioCyc、Reactome 以及 Panther 等) 進行路徑富集分析 (pathway enrichment analysis) 的工具 (Xie *et al.*, 2011)，將目標基因輸入後會先註解再比對至對應的代謝路徑。

3. SNP 定位分析

分析 SM13 及 SM47 中的點突變是利用生物資訊軟體 SnpEff (Cingolani *et al.*, 2012) 偵測 SNP 的位置並且預測編碼造成的影響，採用 SnpEff version 3.6b (build 2014-05-01)，而參考基因體則選用日本晴 (MSU release 7.0)。為了增加資料的準確性，因此綜合 SM13 及 SM47 各自所有的 RNA-Seq 資料，增加比對時的覆蓋厚度，並且序列長度限制在 500 bp 以下。註解定位涵蓋的範圍包括基因上下游 (upstream 和 downstream, 預設長度各 5 kbp)、5' 及 3' 非轉譯區域 (5' 及 3' UTR)、內插子 (intron)、外顯子 (exon) 以及基因間隔區 (intergenic region) 等區域。本研究定義啟動子 (promoter) 的區域為轉錄起始點前 1000 bp，除了啟動子、內插子、外顯子及 5' 及 3' 非轉譯區域 (5' 及 3' UTR) 以外的區域均為基因間隔區。至於編碼的影響包含非同義 (non-synonymous coding) 與同義 (synonymous coding) 以及終止密碼子的變化等。



四、水稻地上部總蛋白質的萃取及含量分析

蛋白質萃取方法參考邱啟洲等人的植物總蛋白萃取流程 (邱等, 1997)。取約 0.2 g 水稻幼苗地上部以液態氮研磨至細緻粉末，加入 1 ml 的蛋白質萃取緩衝液 (含 50 mM Tris-HCl (pH 8.5)、2% 2-ME (β-mercaptoethanol)、1 mM PMSF/DMSO 及稀釋 100 倍 (v/v) protease inhibitor cocktail (P9599, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)) 後再度將組織研磨均質化，置於 1.5 ml 離心管以 11,600 ×g 離心 15 分鐘，吸取上清液加入四倍體積量的丙酮 (經−20°C 預冷) 後置入−20°C 冰箱沉澱過夜。沉澱的蛋白質以 8,000 ×g 離心 3 分鐘後去除含丙酮之上清液，蛋白質沉澱待丙酮自然揮發再加入適量的樣本緩衝液 (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8)、3% SDS (sodium dodecyl sulfate)、5% 2-ME 和 10% glycerol) 溶解。由於蛋白質溶於高濃度的還原劑 (2-ME) 與介面活性劑 (SDS) 中，上述物質均會影響吸光值的測定，因此含量分析採用不受兩者影響的 *RC DC* assay kit I (Bio-Rad, 500-0121) 流程進行定量。Biotek Synergy Mx 微量盤分析儀，並以 bovine γ-globulin (BGG) 所建立的標準曲線用內插法求得蛋白質含量，最後蛋白質樣品分裝小管並保存於−80°C 冰箱。

五、蛋白質單向電泳 SDS 聚丙烯醯胺膠體電泳分析 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE 實驗流程參考並修改自 (Laemmli, 1970)，SDS-polyacrylamide gel 配方參考 Harlow 和 Lane (1988) 配製 12% 分離膠體溶液 (separating gel, 30% acrylamide mix、1.5M Tris-HCl, pH 8.8、10% SDS、10% APS (ammonium persulfate) 及 TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)) (附錄 3) 以及焦集膠體溶液 (5% stacking gel, 30% acrylamide mix、1M Tris-HCl (pH 6.8)、10% SDS、10% APS 及 TEMED) (附錄 4)。

以酒精拭淨鑄膠組合 (玻璃片、陶瓷板與合適的間隔條)，加水確定無滲漏後可繼續操作。依目標蛋白質分子量選擇 12% 濃度的 SDS 膠體溶液，兩片 1.5 mm 厚的膠片約需 25 ml 分離膠體溶液以及 10 ml 焦集膠體溶液。兩混和溶液皆

在倒入鑄膠組合前才加入催化自由基的 TEMED，使用滴管慢慢加入膠體（約八成高），再加入 isopropanol 阻隔氧氣加速凝結。約 60 分鐘凝結後移除 isopropanol，同法注入焦集膠體溶液至頂端，由於凝結快速需要儘快插入樣品槽齒模，需移除膠體中的氣泡。待焦集膠體凝結後取下齒模；若不立刻使用，則利用保鮮膜包覆整個膠片組合置於含水的容器中，於 4°C 約可放 1 至 2 週。

跑膠前架起跑膠台，將電泳緩衝液倒入下方的正極槽，避免氣泡存在膠體底部，接著倒入上方的負極槽。小心移除齒模並注意樣品槽內是否有膠體殘存，可在玻璃板貼上透明樣本槽位置模板增加位置清晰度。取蛋白質 loading 量為 10 μ g，加入含有追蹤染料 bromophenol blue 的 5X sample buffer (FA0020-0025, BIONOVAS, Toronto, Ontario, Canada)，混勻後以 100°C 加熱 10 分鐘。放冷短暫離心後即可取樣本體積 20 ml 注入樣本槽，注入樣本時儘量把針頭或吸管伸到底部。接上電源以 70V 進行電泳 30 分鐘，接著以 180V 跑大約 1 小時，可置於冷房減緩膠片發熱的情形。使用濃度較高的膠片可以等到藍色染料泳出膠體再停止。

拆開膠片組合後移除焦集膠體，並在分離膠片的右上方截角做記號（區別膠片樣品次序）。將膠片放入含有 CBR 染色液 (0.2% Coomassie brilliant blue R-250、50% methanol 及 10% acetic acid) 之容器中染色，室溫下均勻搖晃約 10 分鐘，若要進行蛋白質轉印則不必染色。脫色可用自來水洗掉殘餘的染色液，或倒入約 20 ml 的快速退染液 (5% methanol 及 7% acetic acid) 再繼續搖盪。待脫色數次至背景透明應可看到蛋白質的藍色色帶。

西方墨點轉漬法 (Western Blot) 實驗流程參考並修改自酵素化學實驗 (莊，2005)。等待電泳過程將轉印膜 (PVDF) (Hybond, GE Healthcare, NJ, USA) 切成如膠片大小，並以少許甲醇浸溼活化，另取四張濾紙以及兩片方形海綿墊全部放入轉印緩衝液 (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% (v/v) methanol) 中備用。轉印夾打開平放，依序放置一張方形海綿墊，鋪上兩張溼濾紙，再取出電泳膠片平鋪其上。將潤溼的轉印紙覆蓋於膠片上，確認無氣泡存在後再加蓋兩層濾紙及海綿。

將三明治卡夾放入轉印槽中，轉印紙靠近正極而膠片則為負極，接著將轉印緩衝液注入轉印槽，置於冷房以 400 mA 轉印約 1.5 小時。

以明膠-NET (0.25% Gelatin、0.15 M NaCl、5 mM EDTA、50mM Tris base 以及 0.05% Tween 20, pH 8.0) 作為阻斷劑 (blocking buffer)，取出 PVDF 膜浸潤於其中搖蕩，在室溫下約 30 分鐘。同樣以明膠-NET 稀釋抗體溶液，PVDF 膜在含有一級抗體的溶液中室溫搖蕩 2 小時，或是冷房中過夜。接著以 TTBS 洗液清洗兩次 (15 分鐘/次) 後放入二級抗體溶液，室溫搖蕩 1 小時。免疫染色是利用抗體來偵測轉印紙上面的抗原蛋白質，這裡二抗所放的 anti-rabbit HRP (horseradish peroxidase) 是化學冷光法 (chemiluminescent detection) 中常用的酵素。最後同樣以 TTBS 洗液清洗兩次 (15 分鐘/次) 後製於保鮮膜上，即可準備配製 ECL (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) 的 HRP substrate (peroxide : luminol = 1:1) 進行化學發光法。吸取適當溶液均勻蓋過 PVDF 膜，過程均避光，室溫下反應約五分鐘。蓋上透明膜確定沒有氣泡後即可進入暗房壓片。

*水稻 OsLEA 2h 抗體—可辨認水稻葉片 16 kD 左右蛋白質，稀釋 10000 倍 (由本實驗室提供)。

*大麥 pHVA1 抗體—可辨認水稻葉片 27 kD 蛋白質，稀釋 15000 倍 (由中研院植微所賀端華老師提供) (Xu *et al.*, 1996)。

第四章、結果



一、五種稻在乾旱處理下之外表形態

IR64 與耐旱突變系生長約至三葉齡施以 23.3% PEG 6000 的乾旱逆境。未處理乾旱前觀察外觀，突變系 SM47 與 IR64 的株高與根系分布較相似，而 SM13 的株高較矮小且根系較稀疏。與控制組比較，三者處理 3 小時 (3 hr) 後可以看出莖稈倒伏傾斜程度不一，以 IR64 傾斜幅度最大，SM47 次之，而 SM13 改變最少 (圖 2)。處理 24 小時 (24 hr) 後，IR64 除了莖稈倒伏嚴重，葉片從尖端開始捲曲且葉面積縮小幅度最明顯；SM47 受乾旱影響的程度較 IR64 輕微，葉片尖端雖少部分捲曲但莖稈傾斜程度較小；SM13 則在葉片尖端有些許捲曲其餘與控制組無異。在乾旱 24 小時後回復正常水耕液 24 小時 (R 24 hr)，可以發現 IR64 長出些許嫩綠的新葉，然而捲曲萎凋的老葉仍佔大部分，至於 IR64 突變系的莖稈傾斜幅度減緩，回復情形都良好。綜合以上，無論是乾旱初期 (3 hr)、晚期 (24 hr) 或是回復 (R 24 hr)，IR64 耐旱突變系的外表型均具有較佳的耐受性，符合前人對於三者乾旱敏感度及乾旱存活率的研究 (王，2013)。值得特別注意的是，SM13 雖然較不受乾旱逆境影響生長，擁有明顯的耐受特性，然而它在正常情況下的弱生長勢會影響到成株的產量與品種推廣，因此後續研究將著重分析在作為耐旱候選品種的 SM47。至於 HY15 以及 TCN1 在乾旱處理後的形態差異較不明顯，不過在根系方面，HY15 的根長均比 TCN1 的長，可能有助於缺水逆境下的水分吸收能力。

二、即時聚合酶連鎖反應 (Real-time PCR) 分析乾旱相關基因之表現量

樣品的狀態與品質是 RNA-Seq 結果優劣的一大關鍵，因此在送件前需要確定乾旱是否造成材料的生理反應變化。本實驗挑選乾旱調控相關的轉錄因子 *OsDREB2A* 以及 *OsNAC6*，以及選擇調控細胞骨架的 formin protein 作為內部對照，偵測兩者在樣品遭遇乾旱逆境下的基因表現量，乾旱處理的時間點包括 3、

12、24 小時以及復水 24 小時。由結果可知 (圖 3)，*OsDREB2A* 在逆境下的變化以 SM47 最明顯，在乾旱 3 小時的表現量以 SM47 為最高，其次為 TCN1、SM13 以及 HY15 的 *OsDREB2A*，而 IR64 却不增反減。隨著乾旱時間增加 *OsDREB2A* 的表現量也趨於平常狀態，然而在復水階段，SM47 的表現量又上升約 1 倍，IR64 及 HY15 也輕微增加。*OsNAC6* 在逆境下的變化也以 SM47 最明顯，與 SM13 及 TCN1 同樣在 3 小時的表現量達最高，不過只有 SM47 在復水期的表現量為次之，而 IR64 及 HY15 則是在乾旱 24 小時達最高。乾旱相關轉錄因子在不同材料中的表現不盡相同，不過普遍會受到乾旱處理的影響而改變，因此證實 PEG 6000 所營造的乾旱逆境可以刺激材料產生乾旱的反應機制。

三、利用 RNA-Seq 分析乾旱敏感程度不同的秈稻轉錄體

1. Illumina 定序與基因組裝註解

總共有 20 個樣品利用 Illumina Hiseq 2000 (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) 進行 RNA 定序，平均產生約 22,994,564 個短序列片段 (reads)，為測試最佳的 mapping 結果，利用不同的參考基因體及工具組裝這些 reads。參考基因體包括同為日本晴的 MSU rice 7.0 和 IRGSP-1.0 以及 9311 眩稻，而組裝工具則為 CLC bio 及 TopHat，總共嘗試四種 mapping 方式：MSU_CLC (以日本晴 (MSU rice 7.0) 為參考基因體且在 CLC bio 中操作)、MSU_Tophat (以日本晴 (MSU rice 7.0) 為參考基因體且在 TopHat 中操作)、9311_Tophat (以 9311 為參考基因體且在 TopHat 中操作) 以及 OsNB1 (以日本晴 (IRGSP-1.0) 為參考基因體且在 TopHat 中操作) (表 1)。結果顯示 MSU_CLC 的 mapping 比率在 77.1% 至 83.8% 間，其他由高而低依序為 9311_Tophat (78.6% 至 86.5% 間)、MSU_Tophat (78.6% 至 86.5% 間) 以及 OsNB1 (77.9% 至 85.5% 間)。雖然實驗材料均為秈稻品種，然而兩參考基因體的比對結果差異不大，雖然 9311 的結果較佳但其註解仍未完善，因此仍選用 MSU rice 7.0 作為參考基因體。另外利用不同組裝工具的結果也相近，因此後續分析選擇操作較方便的 MSU_CLC 為 mapping 的結果。reads 比對到的區域

種類分為 exon (包含單一 exon 與 exon-exon) 以及 intron (包含單一 intron 和側翼序列) (表 2)。Mapping 比率在 77.1% 至 83.8% 間，其中比對到 exon 的 reads 約達 97%，僅有 3% 是位於 intron，後續便利用這些 mapped reads 計算基因表現量 RPKM，最後 reads 組裝完成再經基因註解得到 55801 個基因以及 66153 個轉錄子 (transcripts)。

2. 五種秈稻在乾旱逆境下的 DEGs 數量及基因表現趨勢分群

為了比較耐受程度不一的材料中受乾旱影響的基因群，可利用 DESeq 個別偵測五種秈稻在三個乾旱處理狀態下的差異表現基因 (Differentially expressed genes, DEGs)，篩選 \log_2 fold change ≥ 1 或 ≤ -1 並設定 p-value ≤ 0.05 為顯著差異。首先材料間個別混合三個乾旱狀態下的 DEGs，正向調節之 DEGs (依 3 hr/24 hr/R 24 hr 的順序) 數量依序為 HY15 2679 個 (1093/911/675)、TCN1 2520 個 (1079/787/654)、IR64 2456 個 (1019/800/637)、SM13 2067 個 (630/902/535) 以及 SM47 1887 個 (840/742/305)；負向調節依序為 SM47 2123 個 (630/806/687)、IR64 1830 個 (485/760/585)、HY15 1776 個 (470/736/570)、TCN1 1706 (454/764/488) 以及 SM13 1196 個 (326/628/242)。同一秈稻內不同乾旱處理下的 DEGs 經混和後，去除重複即可得到至少在一種乾旱狀態下有顯著差異的基因，此類正向調節的基因數量由多而少依序為 HY15 (1787)、TCN1 (1673)、IR64 (1656)、SM13 (1471) 以及 SM47 (1284)；負向調控的基因數量由多而少依序為 SM47 (1600)、IR64 (1382)、HY15 (1274)、TCN1 (1245) 以及 SM13 (984) (圖 4)。

最後從 5 種秈稻中總共篩選出 5520 個 DEGs，然而為了避免探討表現量過低而可能存在定序誤差的狀況，因此再度挑選至少在一種材料中的表現量總和 $RPKM \geq 15$ 的基因，最後得到 3263 個 DEGs。分別將這些基因的 RPKM 以及各處理組的 \log_2 fold change 利用 MeV 軟體 (Saeed *et al.*, 2003) 分析，觀察 RPKM 的 heatmap (圖 5 A)，由左至右每 4 欄為 1 種秈稻在 0、3、24 小時以及復水 24 小時的基因表現量，秈稻依序為 SM13、SM47、IR64、HY15 以及 TCN1，結果

發現基因的表現趨勢大致相同，然而由於 SM13 的生長勢較差不適合做為耐旱反應的研究，因此後續分析會著重在其他秈稻間的差異比較。接著觀察 SM47、IR64、HY15 以及 TCN1 在乾旱處理下的 \log_2 fold change (圖 5 B)，發現大部分的基因變化趨勢相同且較不明顯，正向調控基因主要在 3 小時上升並持續至 24 小時，而在復水期回復 0 小時狀態。而負向調控則是從 3 小時開始逐漸下降至 24 小時達最多，而復水期同樣回復逆境未處理狀態。

由前人對於 5 種秈稻耐旱生理研究可知，SM47 與 HY15 屬於耐旱型秈稻而 IR64 與 TCN1 屬於敏感型，若基因表現趨勢在兩類型間存在差異，則此類基因有可能為耐旱候選基因。因此本研究利用 heatmap 將 DEGs 表現量趨勢分群 (圖 6) 後挑出 SM47 相對於 IR64 或者 HY15 相對於 TCN1 有差異的基因群，結果一共列出 103 個基因，其中一共有 26 個 expressed protein 以及 17 個非生物逆境刺激相關基因。

3. 不同基因型秈稻在乾旱處理期及復水期的 DEGs 之共通性與差異

本研究利用 venn diagram 統整材料間 DEGs 的分布，因此可看出各自在 3 hr、24 hr 及 R 24 hr 乾旱處理下所參與的基因數量 (圖 7)。從數量多寡來觀察，可以發現四者共通的正向調控基因以 3 hr 為最多，其次為 24 hr 與 R 24 hr，而負向調控基因以 24 hr 為最多，其次為 3 hr 與 R 24 hr。接著挑出至少在一種秈稻中正向調控的 DEGs 以及基因型共通的正向調控 DEGs，以時期為區分利用 agriGO 進行基因分群，包含三種階層：生物途徑 (biological process)、分子功能 (molecular function) 以及細胞組件 (cellular component)，設定 $FDR \leq 0.05$ 為顯著水準。由前者結果 (圖 9) 可明顯觀察到四者在 3 hr、24 hr 以及 R 24 hr 均顯著表現的生物途徑為逆境反應 (GO:0006950)、刺激反應 (GO:0050896)、非生物逆境刺激 (GO:0009628) 以及生物逆境刺激 (GO:0009607)，而分子功能則為轉錄因子活性 (GO:0030528)。另外有些功能是僅在特定時期表現，例如 24 hr 的外在細胞刺激反應 (GO:0009991)、細胞溝通 (GO:0007154) 以及外部刺激反應 (GO:0009605)；

R 24 hr 的 DNA 結合 (GO:0003677)、外部封裝結構 (external encapsulating structure) (GO:0030312)、細胞壁 (GO:0005618) 以及細胞外區 (GO:0005576)。共通正向調控基因的功能大多與上述相同 (圖 10)，不過轉錄因子活性 (GO:0030528) 則僅在 3 hr 表現。

4. 耐旱突變系與 IR64 的轉錄體在乾旱處理前的差異

由於 IR64 與耐旱突變系的外表型在正常情況下已有差異，因此欲從轉錄體表現觀察疊氮化鈉誘變造成的影响。在正常生長情況下，突變系與 IR64 間的差異表現基因可利用 DESeq 篩選出來。SM13 特有的 DEGs 一共有 139 個正向調節及 261 個負向調節基因；SM47 特有的 DEGs 有 227 個正向調節及 108 個負向調節基因；至於兩突變系共通的 DEGs 則有 10 個正向調節及 15 個負向調節基因 (圖 8)。接著利用 agriGO 探究這群 DEGs 的基因功能，設定顯著標準在 FDR (False Discovery Rate) ≤ 0.05 ，結果顯示 SM13 與 SM47 的正向調控 DEGs 並無顯著的 GO term，不過 p-value 前三低的基因功能包括逆境反應 (GO:0006950)、刺激反應 (GO:0050896)、非生物逆境刺激 (GO:0009628)、生物逆境刺激 (GO:0009607) 等功能。而在負向調控中有三個顯著，包括逆境反應 (response to stress) 及刺激反應 (response to stimulus) 以及受器結合 (receptor binding)。為了探討這些基因在乾旱下的變化，利用 heatmap 顯示這些參與逆境刺激相關反應之正向調控基因的表現。

四、以路徑分析不同基因型稻穀對於乾旱反應的差異

乾旱反應牽涉的調控範圍廣泛，為了瞭解整體的代謝路徑在乾旱下的變化，將篩選出來的 3000 多筆正向及負向調控 DEGs 以路徑富集分析找出明顯受影響的代謝路徑。結果可以發現，顯著受乾旱影響的路徑 ($p\text{-value} \leq 0.05$) 為氮素代謝路徑 (dosa00910)、光合系統固氮作用 (dosa00710)、乙醛酸及二羧酸代謝路徑 (dosa00630)、碳代謝 (dosa01200) 等 (表 4)。接著為了分析代謝途徑中的單一基因在不同材料與時間點的變化，因此將途徑中的 DEGs 挑出並以 heatmap 表現

趨勢。除此之外，非顯著受影響的代謝路徑也有可能具有調控乾旱的關鍵基因，因此同樣將可能與逆境相關的代謝路徑挑出討論，例如過氧化氫、澱粉與蔗糖代謝路徑、賀爾蒙訊息傳遞等。



五、IR64 與耐旱突變系在乾旱及復水處理下的蛋白質變化

RNA-Seq 解析 IR64 與耐旱突變系於乾旱處理下的轉錄體表現，然而結果只能顯示 mRNA 層次的基因調控變化，更完善的乾旱反應機制需要整合蛋白質的合成以及轉譯後修飾的活性分析。因此本研究進一步比較乾旱及復水處理下 IR64 與耐旱突變系的蛋白質累積情形。由於實驗室長久以來進行 LEA 蛋白質的研究，因此得以取得 OsLEA2h 抗體，另外再加上賀端華老師提供的 pHVA1 抗體，以 Western Blot 觀察 LEA 蛋白質對於乾旱的反應。在此之前測試 OsLEA2h 與 pHVA1 的合適稀釋濃度分別為 10000 倍及 15000 倍。

一、IR64 與耐旱突變系的地上部總蛋白之 SDS-PAGE 分析

本研究利用 SDS-PAGE 分析 IR64 與耐旱突變系不同處理下的幼苗地上部蛋白質，並且與 IR64 不同成熟時期的胚蛋白做比較，每種樣品測定濃度後均定量 10 μg 跑膠，膠體濃度選擇 12% 以觀察分子量介於 10 kDa 至 200 kDa 的蛋白質。以 Coomassie Brilliant Blue 染色所得的膠圖中可明顯看出胚蛋白與地上部蛋白的差異（圖 26），胚蛋白獨特的條帶大約位於 100 kDa 左右、68 kDa 以及 24 kDa，而地上部蛋白獨特的條帶雖然僅位於 14 kDa，不過還有蛋白質含量較高的條帶位於 63 kDa 以及 28 kDa。另外比較同組織間的蛋白質分布，可以發現胚蛋白的條帶型式隨著發育時期而有些微不同，不過是蛋白質的含量而不是類型的改變。至於乾旱是否會造成蛋白質條帶的變化？由於 Coomassie Brilliant Blue 的敏感度仍不足，電泳膠圖無法明顯區分控制組與乾旱處理組的條帶型式，材料間的差異也無法區別，因此需要進一步利用西方墨點轉漬法（Western Blot）顯現細微的差異。

二、IR64 與耐旱突變系地上部之 LEA 蛋白質表現

為了更精確地比較不同樣品的蛋白質差異，因此將上述 SDS-PAGE 膠圖轉漬到 PVDF 膜上進行 Western Blot，並針對乾旱相關的 LEA 蛋白質分析 OsLEA2h 及 pHVA1 的累積。由結果可知（圖 27），兩種蛋白質在胚與地上部間的條帶型式存在明顯差異，OsLEA2h 在胚中有 5 種條帶，分別位於 21 kDa、28 kDa 以及 35 至 48 kDa 間，地上部主要有 1 種條帶位於 28 kDa。而 pHVA1 在胚中的條帶數量隨生長期而增加，地上部中的條帶僅分布在 33 kDa 及 35 kDa。兩種 LEA 蛋白質在成熟胚中累積最多，種類及累積量均隨著胚的成熟時期而增加，不過除了胚發育時期還有乾旱處理對於蛋白質的累積量有影響。OsLEA2h 在地上部未經乾旱處理的情況下無 28 kDa 條帶的存在，不過經 24 hr 乾旱處理後有累積的情形，而復水處理則會減少累積量。比較此條帶在 IR64 與突變系間的差異，發現差異不明顯，不過 SM47 以復水處理的累積量較少，而 IR64 則是 24 hr 乾旱與復水處理的蛋白質含量差異不大，pHVA1 的 33 kDa 條帶也有相同的趨勢。

六、定位 SM47 中的突變基因

耐旱突變系是 IR64 經由 NaN_3 誘變而成的品系，相似的遺傳背景有助於偵測點突變發生位址，因此利用 SnpEff 預測點突變位點並且註解所造成的影响。由於 SM13 的比對結果無 SNP 存在，因此接下來皆為 SM47 中突變基因的討論。SnpEff 比對的結果得到 28 個突變位點，其中 1 個位於基因間隔區 (intergenic region) (未列於表中)；2 個位於五端非轉譯區 (5' UTR)；5 個位於三端非轉譯區 (3' UTR) 以及 4 個位於內插子 (intron)。而位點導致的影響包括：9 個非同義突變 (Non synonymous coding)、6 個同義突變 (Synonymous coding) 以及 1 個中止密碼子提早發生，形成無義突變 (nonsense mutation) (表 5)。接著將點突變註解結果、胺基酸改變及 \log_2 foldchange 等資料列於表 6，位於 5' UTR 或 3' UTR 的基因，分別為 5' UTR 的 LOC_Os12g42610.1 和 3' UTR 的 LOC_Os03g53550.1、LOC_Os08g02050.1、LOC_Os06g25950.1 以及 LOC_Os11g03540.1。突變基因功



能包括可能與乾旱訊息傳遞相關的 Protein kinase 與 ABA 調控乾旱相關的轉錄因子 AP2，另外還有反轉錄跳躍子 (retrotransposon) 以及調控心皮分化與葉脈發育的 YABBY 基因。至於 9 個非同義突變以及 1 個中止密碼子的註解結果顯示，總共包含 4 個 expressed genes、轉錄因子還有其他蛋白質。

七、水稻已知的耐旱相關基因表現

挑選幾種已知的水稻耐旱相關基因，觀察其基因表現趨勢。基因包含累積滲透調節物質維持細胞膨壓的 dihydroorotate dehydrogenases (DHODHs)、負責賀爾蒙調節的 *TLD1*、抗氧化酵素清除 ROS 的 superoxide dismutase (SOD)、抗旱相關的水通道蛋白 (aquaporin) 以及轉錄因子 *NAC* 基因家族，基因在乾旱處理下的 \log_2 foldchange 皆列於表 8。

第五章、討論



本研究藉由 RNA-seq 提供不同基因型秈稻在乾旱逆境下的轉錄體資料，比較乾旱敏感程度不一的秈稻更能從差異中篩選出乾旱相關調控機制，定序結果得到約 6 萬筆水稻轉錄子 (transcripts)，再利用統計軟體篩選出約 3000 個 DEGs。觀察不同時期的差異有助於理解秈稻在乾旱處理時期的轉錄體反應過程，此外比較基因型相似的 IR64 與耐旱突變系可以排除品種差異的因素，而利用 HY15 與 TCN1 的對照可以輔助耐旱基因的篩選。最後藉由路徑分析的整合推測秈稻在乾旱下的生理調控機制。

一、五種不同基因型的秈稻在乾旱下的轉錄體表現

乾旱處理的時期與基因型的差異均會影響秈稻對乾旱的反應機制，而不受兩者影響持續表現的功能也存在，因此轉錄體表現的討論除了會基於環境或基因型的分類來分析差異，共通的保守性反應也十分重要。首先以同一基因型為主，比較自身在乾旱初期 (3 hr)、晚期 (24 hr) 或是回復 (R 24 hr) 所產生的反應，接著再著重跨不同基因型間的比較，找出共通或是在特定基因型才表現的 DEGs。DEGs 的篩選條件包含處理組與控制組之比值取 $\log_2 \geq 1$ 或 ≤ -1 ，並設定顯著標準為 $p\text{-value} \leq 0.05$ ，後續分析為避免篩選到表現量過低的基因，前人研究篩選 $RPKM > 3$ 的基因以供後續分析 (Cui *et al.*, 2013)，因此本研究加上篩選條件為每個基因至少在一種材料的 0 hr、3 hr、24 hr 以及 R 24 hr 之 $RPKM$ 總和 ≥ 15 。

1. 不同乾旱處理時期的整體反應

由於乾旱逆境相關基因的調控相當複雜，因此在研究時最好分類基因反應的時機以協助釐清機制，主要可分為初期或是晚期反應的基因。初期的感知訊息傳遞發生的十分快速 (數分鐘)，此時的基因種類大多為活化下游晚期反應基因的轉錄因子；晚期反應基因則被活化的時間較晚 (數小時)，不過表現時間會較持續 (Zhu, 2002)。在 3263 個 DEGs 中有許多種調控形式，有少部分從 0 小時至復

水期持續表現的基因，也有僅在乾旱處理下上升或下降的基因。至少在一種乾旱時期下正向調控基因約佔一半，大部分在乾旱處理 3 小時被誘導並持續至 24 小時，至於復水期則回復正常狀態（圖 5 B）。正向調控的 DEGs 數量隨著乾旱時間增加而遞減，從 3 小時的 1700 個減少至 24 小時的 1365 個，復水期則介於兩者（1465 個）；負向調控的數量則是隨著乾旱時間而增加，從 1084 個、1372 個到復水期的 1404 個。無論是水稻還是陸稻在乾旱下的轉錄體研究均顯示，稻一旦接收到乾旱訊息便會快速地改變基因表現量啟動乾旱反應（Degenkolbe *et al.*, 2009; Rabbani *et al.*, 2003）。

將上述 3、24 及 R 24 hr 各自的正向調控基因進行 gene ontology 分析的基因功能（圖 9），顯著 GO 功能 ($FDR \leq 0.05$) 的調控形式可分為三群：(1) 三種乾旱時期均表現，基因包含常見的逆境調控相關基因，LEA 及熱休克蛋白質 (heat shock proteins, HSPs) 以及 universal stress protein 等，還有轉錄因子例如 AP2-EREBP、MYB、HBP-1b 以及 bHLH 家族等。(2) 在乾旱 3 與 24 hr 表現或是 24 與 R 24 hr 表現，例如 cytochrome P450、protease inhibitor 及 ABC-2 type transporter 等，轉錄因子例如 AP2-EREBP、NAM、C3HC4 家族等。(3) 僅在 24 hr 或是 R 24 hr 表現，例如 HSPs 以及 osmotin 蛋白質，較多種類的轉錄因子例如 AP2-EREBP、MYB、NAM、bHLH、C2H2 家族等。接著是將 3、24 及 R 24 hr 乾旱處理中四種稻共有的正向調控基因進行 GO 分析（圖 10），調控形式同樣可以分為三群，不過第二群只存在乾旱 3 與 24 hr，而第三群則僅有 3 hr 的轉錄因子活性。

乾旱初期的反應在不同基因型間大致相似，乾旱 24 小時及復水期參與的調控分子活性均增加，有些功能還僅存在特定的乾旱處理時期（圖 9）。glycosyl hydrolase family、protein disulfide isomerase (LOC_Os01g58194.1)、aminotransferase (LOC_Os04g52450.2) 以及 serine/threonine-protein kinase receptor precursor (SAPK) (LOC_Os05g42210.1)、dihydroorotate dehydrogenase protein (DHODH1) (LOC_Os02g50350.2) 等都是特定 24 小時表現的相關基因，

並且均參與水稻對於逆境的反應的調控中，例如 glycosyl hydrolase 是 ROS 的清除者，不管在正常或逆境的環境均可增加作物的產量 (Jeong *et al.*, 2010)。SAPK4 可以調控植物在鹽害逆境下的生長發育與維持離子平衡，因此是協助植物適應鹽害的調控因子 (Diedhiou *et al.*, 2008)。OsDHODH1 除了冷害之外，會受到鹽害、乾旱以及外加 ABA 的誘導，過量表現 *OsDHODH1* 的轉殖株除了促使 DHODH1 的活性增加，也會提升植物的對鹽及乾旱的耐受性 (Liu *et al.*, 2009)。至於僅在復水期參與的基因調控主要位於細胞壁及細胞外區，細胞壁的部分以 chaperone 調控的基因多，包含 glycosyl hydrolase family、DnaJ (HSP40) (LOC_Os02g43930.2)、DnaK (HSP70) (LOC_Os03g16920.1)，另外還有 expansin (LOC_Os05g39990.1)、chitinase family protein (LOC_Os04g41680.1) 以及 conserved hypothetical protein (LOC_Os06g02510.5) 等。在復活植物 *Craterostigma plantagineum* 的水分逆境研究中發現，其細胞壁的延展與彈性會受到缺水與復水影響而提升，並且細胞壁中的 expansin 含量也會增加，因此推測 expansin 與水分逆境下的細胞壁延展性有關 (Jones and McQueen-Mason, 2004)。至於細胞外區中比較特別的基因包括 porphobilinogen deaminase (PBGD) (LOC_Os02g07230.3)、cupin domain containing protein (LOC_Os03g48780.1) 以及 defensin and defensin-like DEFL family。過量表現 *CaMSRB2* (pepper (*Capsicum annuum*) methionine sulfoxide reductase B2) 轉殖水稻具有較佳的耐旱性狀，氧化逆境及光合作用被乾旱抑制的效應較輕微，研究中發現 PBGD 為 CaMSRB2 的受質，MSRB 可能透過 PBGD 影響反向訊息傳遞 (retrograde signaling) (Kim *et al.*, 2014)。Defensin 除了被生物逆境誘導，也會被非生物逆境例如乾旱、鹽害和冷害所影響，因此欲研究訊息傳遞與基因表現間的交互作用可以分析 Defensin 的反應機制。

2. 不同基因型秈稻間的乾旱反應

雖然秈稻間各自的 DEGs 數量不如預期與基因型的耐旱特性相關 (圖 4)，從 DEGs 的功能分析或許能解釋基因型間的耐旱程度差異，因此利用 GO 分析比

較四種秈稻在 3、24 及 R 24 hr 下的 DEGs 功能（圖 11）。不管在乾旱處理或是復水期，都可以發現僅在 SM47 表現的顯著功能，乾旱初期不同秈稻間的反應差異不大，參與基因的功能大多與逆境刺激反應相關，然而特別的是，僅有 SM47 的碳水化合物代謝路徑與分解代謝反應顯著上升，其中的基因包括 inositol 1, 3, 4-trisphosphate 5/6-kinase (LOC_Os02g26720.1)、trehalose-6-phosphate synthase (LOC_Os02g54820.1) 以及 sucrose synthase (LOC_Os03g22120.2) 的上升倍數在 SM47 及 IR64 間差異較大。上述基因主要與 osmolytes 的生合成調控有關 (Chaves and Oliveira, 2004)，在 2011 的研究中，T-DNA 插入 *OsITPK2* 突變株的脯胺酸與可溶糖明顯減少，因此證實 inositol 1, 3, 4-trisphosphate 5/6-kinase 的表現對於水稻在乾旱及鹽害的耐受性很重要 (Du *et al.*, 2011)。乾旱 24 小時除了秈稻間共通的逆境刺激反應相關，SM47 與 TCN1 各自有獨特的分子機制被誘導，其中 SM47 的正向顯著基因與上述 24 小時被誘導的基因一致。至於秈稻基因型間的差異在復水期較明顯，不同基因型秈稻可能採取獨特的復水期反應機制。

二、耐旱突變系與 IR64 的轉錄體存在本質的差異

研究作物對於乾旱調控機制除了比較不同基因型間對於乾旱反應的差異，作物自身基因型所產生的影響也需要考量，因此為了分析 IR64 與耐旱突變系本質的差異，將三者在正常狀態下的轉錄體資料利用 DESeq 比較篩選出 DEGs，結果 SM13 與 SM47 分別具有 149 及 237 個正向調控基因；276 個及 123 個負向調控基因。前人在阿拉伯芥的研究中提到，植物的耐鹽性可能是由於逆境相關基因不管在逆境或非逆境情況下的過量表現 (Taji *et al.*, 2004)，因此耐旱作物中若有基因在尚未遭遇到逆境的情況下高度表現，則可能為耐旱特性的關鍵。正向調控基因中挑出屬於逆境反應 (GO:0006950)、刺激反應 (GO:0050896)、非生物逆境刺激 (GO:0009628)、生物逆境刺激 (GO:0009607) 等功能的基因，以 heatmap 特別觀察 SM47 與 IR64 遭遇乾旱的變化，可以發現大部分基因在乾旱處理時仍會繼續表現，但是卻一致在復水期下降或是回到正常狀態。

三、SM47 與 HY15 在乾旱下正向調控的 DEGs 可能為耐旱候選基因

由前人研究可知四種材料中的 SM47 與 HY15 為耐旱性較佳的秈稻，因此推測乾旱過程中兩者正向調控的 DEGs 可能為耐旱特性的關鍵。在 3000 多筆 DEGs 中，特別在 SM47、HY15 獨特的或是兩者共同上升的正向調控基因一共有 103 個基因，秈稻間差異明顯的表現趨勢大約一半是 SM47、HY15 獨特表現的，至於 SM47 與 HY15 共同明顯上升的基因只有 7 個，包括 gibberellin receptor GID1L2 (LOC_Os07g44850.1)、transferase family protein (LOC_Os08g02030.1) 以及 PB1 domain containing protein (LOC_Os05g35260.2)，其餘四個均為 expressed protein。GA 在乾旱逆境下的調控會藉由促進細胞壁的鬆動而刺激細胞的延展，而 GA 的代謝酵素 GA-2-oxidases (GA2ox) 會被逆境誘導而降低 GA 的活性，並且穩定 DELLA 蛋白質與生長，其中 GID1 蛋白質會偵測 GA 的生物活性並且與 DELLA 產生交感 (Griffiths *et al.*, 2007; Magome *et al.*, 2008)。在 *Brachypodium distachyon* 的研究中發現，GID1L2 的 3 種 isoform 受到乾旱刺激後 呈現不同的調控方式，Bradi1g56860 及 Bradi4g32300 為負向調控而 Bradi4g32310 為正向調控，由此結果推測出當 GA 對細胞擴增的影響較輕微時，可能是由於 GID1L2 的訊息傳遞而非 GA 的降解 (Verelst *et al.*, 2013)。由於 transferase family protein 是一種 acyltransferase 的 expressed protein，目前仍不確定其功能，不過也有前人研究其他 acyltransferase 與乾旱逆境的關係，例如在 MYB96 調控的 wax 生合成途徑中，*WAX ESTER SYNTHASE/ACYL-COA: DIACYLGLYCEROLACYLTRANSFERASE1* (WSD1) 會明顯受到乾旱及外加 ABA 的誘導 (Seo *et al.*, 2009)。phox and bem1 (PB1) 是屬於雙 CBS domain 蛋白質的 domain，包含雙 CBS domain 及 PB1 domain 的蛋白質稱為 CBSCBSPB，目前植物中的 PB1 domain containing protein 的了解仍不多，不過從 CBSCBSPB 的研究推測其功能可能會與其他蛋白質或其他配位基 (ATP、ADP 或 SAM) 作用，調控細胞間的訊息傳遞 (Kushwaha *et al.*, 2009)。

除了上述基因在 SM47 與 HY15 共同明顯上升，其餘基因可分為特定在 SM47 或 HY15 明顯表現，或是基因型間的表現趨勢相近，但在 SM47 或 HY15 的正向

調控較明顯。此類基因依功能可區分為逆境相關蛋白質 (LEA 以及 HSPs)、osmolytes 的生合成調控、轉錄因子以及跳躍子 (transposable element, TE)。LEA 以及 HSPs 蛋白質為兩種典型的逆境誘導蛋白質，會在水份、鹽以及熱逆境情況下累積，並且扮演保護細胞度過逆境的角色 (Boston *et al.*, 1996; Gilmour *et al.*, 1998; Vierling, 1991)。DEGs 中的逆境相關蛋白質，包括第三群 LEA 蛋白質 (LOC_Os01g50910.2) 以及不屬於主要 7 群的 HVA22 (LOC_Os08g36440.1)。HVA22 最早是從大麥 (*Hordeum vulgare L.*) 種子的糊粉層發現，並且廣泛存在於真核生物 (阿拉伯芥、線蟲、老鼠以及人類) 中，在原核生物中則沒有發現 (Shen *et al.*, 2001)。在 2013 年利用 *E. coli* 表達系統的研究中，當 *E. coli* 遭受鹽害逆境，HVA22 的含量會增加並保護細菌的蛋白質、細胞膜及細胞免於受損，因此提升其逆境耐受性 (Lu, 2013)。乾旱相關基因還有包含 HSP20/alpha crystallin family protein (LOC_Os03g16020.1 及 LOC_Os01g04380.1) 以及 HSF-type DNA-binding domain containing protein (LOC_Os03g53340.1)。HSPs 主要的功能為分子伴護子 (molecular chaperones)，調控蛋白質從合成、轉移、成熟至降解的過程。除此之外，在逆境下還有穩定蛋白質與細胞膜以及協助蛋白質重新折疊的功能，不只受熱逆境誘導，水份、鹽害、低溫以及氧化逆境均會影響 (Boston *et al.*, 1996; Gilmour *et al.*, 1998; Vierling, 1991; Wang *et al.*, 2003)。

四、乾旱反應路徑富集分析

植物受到乾旱逆境的影響包括生長受抑制以及乾物質累積減少等外觀形態的變化，而造成這些反應的原因則是低水分潛勢導致植物無法進行正常的生理代謝過程，包括提供能量的光合作用、脂質與蛋白質生合成以及其他重要代謝路徑。不過植物仍然會採取防禦機制降低損害，例如促進 osmolytes 的生合成以調節細胞滲透勢並維持膨壓，或是增加活化氧族清除者避免氧化逆境傷害。植物從感知逆境到外觀變化經過繁複的調控機制，為了更全面性的分析耐旱與敏感品種間的代謝調控差異，必須跳脫單一基因的變化並且找出受乾旱影響的代謝路徑。受乾

旱誘導的基因功能包含乾旱反應與後續建立的乾旱耐受機制，從路徑分析的結果來看（表 4），顯著影響的代謝路徑包含維持生理功能的碳氮代謝相關路徑，例如光合與固碳作用、氮素代謝與糖解作用等，並且參與其中的基因大部分為負向調控，以上為植物遭受乾旱逆境所產生的反應。至於可能與乾旱耐受性相關的途徑則有乙醛酸及二羧酸代謝路徑、五碳糖磷酸鹽途徑、植物角質及蠟質生合成等代謝途徑。

1. 乾旱反應相關代謝途徑

植物遭受乾旱所產生的反應可由基礎生理代謝途徑觀察，植物在乾旱情況下由於水分運輸受阻，連帶抑制氮素的吸收，因此會引發氮素代謝複雜的變化。從路徑富集分析結果也顯示氮素代謝路徑是受乾旱影響最為顯著的生理功能，途徑中約一半以上的基因为 DEGs 且大部分在乾旱下為負向調控，或是在復水期明顯被抑制。值得注意的是除了 SM47，其他三種水稻的 glutamine synthetase (GS, EC 6.3.1.2) 在乾旱 3 及 24 小時均為正向調節，其中又以 TCN1 的上升調控最為明顯（圖 12）。水稻利用 ammonium 作為主要的氮素來源，並且利用 GS 將其同化為 glutamine，因此 GS 是氮素循環中的關鍵酵素。前人的研究提到細胞質中的 OsGS1;1 (GS1 異構物) 在乾旱下的變化，其在敏感品種 IR64 葉片的表現量明顯高於耐旱品種 Khitish，推測有可能是由於 IR64 的蛋白質降解速率快所導致 (Singh and Ghosh, 2013)。Tabuchi 等人也提到 OsGS1;1 具有蛋白質降解後再度活化 (remobilization) 與再利用 (reutilization) 氮素的功能 (Tabuchi *et al.*, 2007)。由於 GS 異構物的表現會受到乾旱影響，並且隨著植物的耐旱特性以及不同組織的表達而相同，若能維持 OsGS2 以及提升 OsGS1;1 的表現，或許可協助植物增進乾旱逆境的耐性 (Singh and Ghosh, 2013)。

糖解與糖質新生作用是碳素重新分配且產生能量的重要途徑，大部分參與的基因表現均受到乾旱抑制，不過仍有一些基因为正向調控（圖 19），其中包含 aldehyde dehydrogenase (ALDH) (EC 1.2.1.3)、2,3-bisphosphoglycerate-independent

phosphoglycerate mutase (iPGAM) (EC 5.4.2.12) 以及 dehydrogenase E1 component domain containing protein (EC 1.2.4.1) 等。ALDH 在植物中扮演重要角色，除了糖解與糖質新生作用也參與許多代謝與生合成途徑，例如 carnitine 生合成與胺基酸代謝，*ALDH* 基因家族可分為 13 群 (Broker *et al.*, 2013)。前人研究證實 *ALDH* 與逆境調控相關，水稻中有 20 個 *ALDH* 基因，其中有些被乾旱、鹽害以及 ABA 誘導，這顯示 *ALDH* 可能具有協助水稻適應滲透壓逆境的功能 (Gao and Han, 2009)。iPGAMs 是糖解作用中關鍵的酵素，負責催化 3-phosphoglycerate 反應形成 2- phosphoglycerate，前人在喪失 iPGAMs 活性的阿拉伯芥轉殖株研究發現，其氣孔受到藍光、ABA 以及低 CO₂ 調控的活動異常，並且抑制營養器官與花粉的發育，因此顯示 iPGAMs 對於保衛細胞功能及繁殖力的重要性 (Zhao *et al.*, 2011)。

另外光合作用等能量供給途徑也是明顯受乾旱影響的生理功能，C4 光合作用中的 Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC)、NADP-malic enzyme (NADP-ME) 以及 pyruvate phosphate dikinase (PPDK) 是濃縮 CO₂ 相關的酵素，不過他們非光合的異構物在所有植物中均存在，並且具有維持 pH 值與補充檸檬酸循環中間產物的功能，因此協助胺基酸與其他化合物的合成，以及提供生合成與抗氧化系統所需 NADPH (Doubnerová and Ryšlavá, 2011)。從 heatmap 可發現 NADP-ME (EC 1.1.1.40) 在四個水稻中均受到乾旱誘導上升，並且以 24 小時為高 (圖 13)，符合前人提到 NADP-ME 會參與一些逆境反應例如乾旱、鹽害、重金屬以及缺磷及鐵的環境中 (Doubnerová and Ryšlavá, 2011; O'Leary *et al.*, 2011)。另外菸草的 NADP-ME 受到乾旱的影響後的基因表現量及蛋白質均增加，不過只限於葉綠體中的 NADP-ME 異構物，而可以進行蘋果酸脫羧作用產生 CO₂ 及 pyruvate (Doubnerova Hyskova *et al.*, 2014)。阿拉伯芥過量表現水稻 NADP-ME₂ 的轉殖株具有高鹽及乾旱的耐受性 (Liu *et al.*, 2007)，雖然顯示 NADP-ME 可能具有協助植物渡過逆境的功能，不過目前還不確定是否適用所有植物。

2. 耐旱相關代謝途徑

澱粉與蔗糖代謝路徑中正向與負向調控的 DEGs 數量差不多，並且主要在乾旱 3 及 24 小時反應，並在復水期回復正常狀態（圖 15）。其中 SM47 的 trehalose-6-phosphate synthase (TPS) (Os02g0790500) 在乾旱下的反應最為明顯，約上升 1024 倍，而 IR64 則無顯著變化。trehalose 是一種普遍存在於菌類及植物中的非還原雙糖，不過除了復活植物，其在高等植物中的含量極低 (Paul *et al.*, 2008)。TPS 是催化 glucose-6-phosphate 與 UDP-glucose 形成 trehalose-6-phosphate 的酵素，而 trehalose-6-phosphate phosphatase (TPP) 則將 trehalose-6-phosphate 去磷酸化產生 trehalose (Cabib and Leloir, 1958)。在植物中過量表現 *E. coli* 及線蟲之 TPS 及 TPP 的研究不少，植物均能提升對非生物逆境的耐受性，然而缺點在於生長勢受到限制，普遍發育不良與畸形 (Goddijn *et al.*, 1997; Romero *et al.*, 1997)。不過在 2013 年的研究中，轉殖番茄可以藉由轉入 TPS 及 TPP 的融合基因提升乾旱及鹽害耐受性，另外相較於野生型的光合效率為高，因此也具有正常的生長發育 (Lyu *et al.*, 2013)。trehalose 對於水稻逆境耐受性十分重要，過量表現 *E. coli* 的 trehalose 生合成基因 (*OtsA* and *OtsB*) 之轉基因水稻具有較佳的耐性，在乾旱、鹽害及低溫的狀態下能維持生長發育，光氧化傷害較輕微且維持礦物質平衡 (Garg *et al.*, 2002)。在 2003 年水稻的研究中發現，*TPSP* 轉殖水稻同樣獲得逆境的耐受性，值得注意的是，葉片中的 trehalose 含量為轉殖菸草的 200 倍，因此推測雖然 trehalose 在普遍物種均有保護功能，且水稻獲得耐受性的程度可能高於雙子葉植物 (Jang *et al.*, 2003)。

乙醛酸及二羧酸代謝路徑存在於過氧化體 (peroxisome) 與乙醛酸循環體中 (glyoxysome)，為碳水化合物從脂肪酸或二碳前驅物 (acetyl-CoA) 合成的重要途徑，與脂質分解及醣重新合成有關，特別在種子發芽或葉片老化以及發病過程會被誘導，其中 isocitrate lyase (ICL) 與 malate synthase (MS) 為關鍵酵素 (Dunn *et al.*, 2009; Eastmond *et al.*, 2000)。此途徑在四種水稻對於乾旱的反應中大致為負向調控，不過有三個基因在基因型間有不同的表現趨勢，並且在乾旱 3 及 24 小



時會受到誘導，分別為在氮素代謝提過的 glutamine synthetase (EC 6.3.1.2)、malate synthase (EC 2.3.3.9) 以及 isocitrate lyase (EC 4.1.3.1)，malate synthase 在 IR64 與 HY15 的三種處理時期均上升，而 SM47 與 TCN1 則在乾旱下變化不大但復水期下降，至於 isocitrate lyase 受誘導的趨勢則是四種秈稻一致（圖 16）。在早期利用 PEG 营造水分逆境的研究已發現 isocitrate lyase 會隨著逆境在玉米及小麥中累積 (Luna *et al.*, 1985)，近年研究也提到 malate synthase 及 isocitrate lyase 可能扮演調控水稻在乾旱逆境的重要角色，處理乾旱的水稻基因表現量高於未處理的近 20 倍，而此高表現量可能會使 glucose 累積，不過在阿拉伯芥中就無此現象 (Maruyama *et al.*, 2014)。

過氧化體中清除 ROS 的能力也是植物是否具有耐旱特性的關鍵，由 heatmap 可看出在四個秈稻間均被誘導的清除者包括 acyl-CoA oxidase (ACOX)、hydroxymethylglutaryl-CoA lyase (HMGCL)、xanthine dehydrogenase (XDH)、superoxide dismutases (SOD) 以及 fatty acyl-CoA reductase (FAR)，其中以 SOD 較存在基因型間的差異，SM47 的 SOD 明顯從 3 小時開始表現並持續至復水期（圖 23），至於其他秈稻均在復水期下降或是回復至正常。由前人偵測 MDA 及 H₂O₂ 的結果發現中，SM47 與 HY15 的過氧化物累積均較 IR64 及 TCN1 為低，顯示兩者遭受的氧化逆境較輕微，因此清除 ROS 的能力有可能為 SM47 較具耐旱性的關鍵。

乾旱通常會造成植物中自由形式的胺基酸含量增加，在 *Brassica napus* 葉片的研究中，提到大部分胺基酸含量會與乾旱強度呈線性關係 (Good and Zaplachinski, 1994)。在乾旱下的正向調控以 HY15 的 succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH; EC 1.2.1.24) 以及 SM47 的 aminotransferase (EC 2.6.1.44) 最為明顯（圖 17），關於 SSADH 與 aminotransferase (EC 2.6.1.44) 在逆境的研究中較少發現。另外 alanine aminotransferase (EC 2.6.1.2) 在 heatmap 中顯示在乾旱處理下無明顯差異，符合前人偵測此基因在乾旱下的活性並無增加 (Good and Zaplachinski, 1994)。至於五碳糖磷酸鹽途徑中以 SM47 在 phosphoribosyl

pyrophosphate synthetase (EC 2.7.6.1) 的正向調控最為明顯且獨特 (圖 21)，phosphoribosylpyrophosphate (PRPP) 是重要的中間產物，特別是核酸、amino acids histidine 以及色胺酸的生合成 (Koslowsky *et al.*, 2008; Stepansky and Leustek, 2006; Zrenner *et al.*, 2006)，因此 PRPP 的充足對於代謝運作以及生長發育十分重要，phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 是將 ribose 5-phosphate (R5P) 與 ATP 反應合成 PRPP 的酵素，目前關於此基因的研究仍不多，是否與逆境的調控相關仍需進一步確認。

植物可以藉由累積小分子量的 osmolytes 例如脯胺酸、醣類以及 polyamines 度過不合適的環境，多元胺包括 polyamines (PAs)、spermidine (Spd)、spermine (Spm) 以及前驅物 putrescine (Put) 是細胞生長與分化重要的元素。其中 ornithine decarboxylase (ODC; EC 4.1.1.17) 是 polyamines 生合成的關鍵酵素之一 (Roy and Roy, 2013)，因此與逆境的調控相關。先前的研究指出 ODC 與 arginine decarboxylase (ADC) 在禾本科葉片中的活性會被逆境誘導 (Flores *et al.*, 1984)，另外的研究則顯示兩者在長期的鹽害逆境無明顯差異，然而短期則可分別誘導 2.5 及 1.8 倍，雖然 ODC 的誘導倍數較多，不過 ADC 才被認為是禾本科的逆境相關基因 (Das *et al.*, 1995)。至於精胺酸及脯胺酸代謝途徑中以 ALDH (EC 1.2.1.3) 及 GS (EC 6.3.1.2) 的變化最為明顯 (圖 18)，兩者同時分別與氮素代謝路徑及糖解與糖質新生作用相關，在 SM47 中的表現量均低。在 2013 年的 IR64 與其突變系之脯胺酸含量研究中，葉片經 PEG 乾旱處理一天的含量以突變系的較高，不過處理兩天後以 IR64 的含量明顯增加，至於根部則為突變系的含量略高 (王, 2013)。Busa 等人的研究也提到當 IR-29 (鹽害敏感)、Pokkali (耐鹽品種) 以及香米 (Pusa Basmati) 遭遇 PEG 乾旱逆境，脯胺酸與蔗糖在 IR-29 以及香米中累積較多，兩者為維持敏感品種生存的重要滲透調節物質；至於 Pokkali 則由於 glycine betaine 及 polyamines 含量較高，改善相對水分含量及酵素活性而產生較明顯的耐受性 (Basu *et al.*, 2010)。

五、IR64 與突變系的 LEA 蛋白質在乾旱下的轉錄體與蛋白質表現

LEA 蛋白質主要是低分子量蛋白 (10–30 kDa)，會在種子與花粉成熟時累積，而在營養器官的累積則是會受到乾旱、鹽害、極端氣溫或是外加 ABA 所誘導 (Baker *et al.*, 1988; Imai *et al.*, 1996)。其生合成、基因表現及活性都受到許多因子 (發育時期和賀爾蒙等) 和訊息傳遞路徑影響。許多研究已證實 LEA 的累積與水稻 (Moons *et al.*, 1995; Moons *et al.*, 1997)、小麥 (Ried and Walker-Simmons, 1993) 以及燕麥 (Maqbool *et al.*, 2002) 的逆境耐受性有關。因此從轉錄體資料可以明顯看出，有些 *LEA* 基因的表現量會隨著種子成熟而增加，而在地上部中則是會被乾旱所誘導 (圖 25)。第一群蛋白質主要的功能在於胚乳的發育與高等植物營養器官的滲透勢保護，第二群則是扮演分子伴護子的角色，保護蛋白質結構，與高等植物的耐受性密切相關 (Chen *et al.*, 2003)。第三群則負責在植物脫水時增加離子濃度以免失水過多，大麥 PMA1949 以及大豆 pGmPM2 即屬於這一群 (Hong-Bo *et al.*, 2005)。由本研究 Western Blot 的結果可以看出 *LEA* 第二及三群的蛋白質確實在乾旱處理的幼苗地上部中累積 (圖 27)，不過 *IR64* 與其突變系間的累積量差異不大，因此 *LEA* 可能不是造成耐旱性差異的主要因素。至於水稻的耐旱性與 *LEA* 蛋白質的關係為何？先前研究在耐鹽稻品種的根部中發現，dehydrin 與第三群 *LEA* 蛋白質的累積明顯多於敏感品系；根部經過滲透逆境處理後，內生 ABA 的含量也多於敏感品系 (Moons *et al.*, 1995)，因此，*HVA1* 轉基因水稻的耐旱性也同樣提升，在逆境下生長速度相較於野生型為快，同時延遲乾旱造成的損害並改善逆境解除時的回復力，因此推論耐旱性狀的提升與 *HVA1* 蛋白質的累積有關 (Ismail *et al.*, 1997)。另外 *OsLEA3-1* 過量表現水稻突變株具有良好的耐旱性，並且不會導致產量的損失 (Xiao *et al.*, 2007)。

六、SM47 突變基因可能為耐旱候選基因

為了探討疊氮化鈉實際造成耐旱突變系基因體上的改變，利用生資軟體定位出 SNP 後再以 SnpEff 整合並註解 *IR64* 耐旱突變系的點突變位置，最後在 *SM47*

的地上部轉錄體中發現 25 個 SNP 的分析結果 (表 6)，不過在 SM13 的地上部轉錄體中則無發現。然而此結果並非顯示 SM13 不會受疊氮化鈉的刺激產生點突變，SNP 可能存在於 intron 或 promoter 區域，也可能位於組織專一表現的轉錄體中，另外轉錄體的低覆蓋率也會導致偵測的困難。而分析 SM47 的 SNP 的種類發現，非轉譯區 (untranslated region, UTR) 突變的基因共有 5 個，轉錄因子包含 AP2 (LOC_Os11g03540) 及 YABBY (LOC_Os12g42610) 的表現量在基因型間差異較大，並且均以 SM47 在復水期的上升倍數為最高。側生組織的近軸面或遠軸面 (adaxial-abaxial) 極性是由原基與頂端分生組織的調控因子所控制，其中 YABBY 基因家族負責調控遠軸細胞命運 (abaxial cell fate) (Bowman, 2000)。另外過量表現 *YABBY1* (*YABI*) 的轉殖水稻會導致半矮型但可藉由外加 GA 回復，*YABI* 可能與 GA response element (GARE) 結合並存在 *GA3ox2* 啟動子中，因此 *YABI* 可能參與 GA 生合成中的回饋調控 (Dai *et al.*, 2007)。至於造成 early stop codon 的 SNP 位於跳躍子中因此對於正常功能的影響不大。而造成非同義突變的 9 個基因中，bHLH 與 PHD finger 為逆境所誘導並且增加轉基因作物的耐受性，bHLH 屬於離層酸誘導的乾旱逆境相關轉錄因子 (Abe *et al.*, 2003)，不過它在 5 個秈稻品種中表現量均不高 (RPKM 約為 2)，因此可能不是導致耐旱性的關鍵基因。至於 PHD finger protein 則會受到鹽害誘導 (Kasuga *et al.*, 1999)，不過它的表現量在秈稻間的差異仍然不大。比較值得注意的是 expressed gene (LOC_Os11g03190) 在 IR64 的正向調控幅度遠低於其他品系，然而此基因在所有樣品中的 RPKM 介於 0.01 至 0.29 間，因此可信度較低。另一個 expressed gene (LOC_Os04g49940) 為阿拉伯芥中 DnaJ/HSP40 cysteine-rich domain superfamily 蛋白質的同源基因，且其表現量會在 SM47 的復水期上升 (\log_2 foldchange = 0.66)，然而仍低於 IR64 (\log_2 foldchange = 1.17)。蛋白質的活性畢竟受到許多因素影響，單一胺基酸的改變未必能直接造成功能的變異，因此這些 SNP 坐落的基因還需要進一步的確認是否在蛋白質層次發生變化。

第六章、結論



水資源的供給隨氣候變遷異常而導致水稻產量大幅損失，而現行農業技術對於產量的維持與提昇仍有限，因此必須就遺傳層次的改良才能因應糧食問題。然而耐旱機制是多數量性狀遺傳，受到不同基因型和環境的影響故不易探討，本研究期望歸納出水稻轉錄體在乾旱下的反應與耐旱機制，藉由資訊的交叉整合加速國內耐旱水稻育種並調整旱稻栽培模式及策略。

DEGs 的功能會隨著乾旱處理時期以及基因型而改變，不同秈稻在乾旱初期的反應相似但 24hr 及回復期則漸漸採取不同機制，特別是細胞溝通與細胞壁內的生理反應。而基因型的差異以 SM47 較為明顯，SM47 獨特的耐旱相關基因功能包含訊息傳遞及碳水化合物代謝路徑等，在 SM47 與 HY15 共同調控的 DEGs 同樣存在許多逆境調控相關基因。另外利用生資軟體分析秈稻地上部轉錄體也定位出 IR64 與 SM47 間的 SNP。SM47 的生長勢及耐旱生理指標均顯示其具有耐旱特性，推測可能主要是由於滲透調節物質、活化氧族清除者的生合成所造成。這些存在不同基因型的 DEGs 均可能為耐旱候選基因，然而仍需要進一步的研究以驗證功能。這些結果期望能提供乾旱反應的背景知識並加速耐旱水稻的育成。

表 1、使用不同參考基因體與生資工具的序列比對 (mapping) 結果

Table 1. Mapping of RNA-Seq reads obtained from shoot samples of 5 indica rice genotypes by different reference genomes and assembly tools

Library	Raw Read	MSU_CLC	MSU_Tophat	9311_Tophat	OsNB1_Tophat
SM13_0 hr	22,609,066	83.4%	81.7%	83.2%	81.7%
SM13_3 hr	21,978,228	82.4%	84.6%	83.9%	84.5%
SM13_24 hr	22,451,860	80.5%	82.2%	84.1%	82.2%
SM13_R 24 hr	23,979,662	81.7%	83.4%	84.6%	83.3%
SM47_0 hr	23,303,096	82.6%	80.7%	82.1%	80.6%
SM47_3 hr	22,579,886	78.5%	79.0%	80.5%	78.9%
SM47_24 hr	22,234,400	80.0%	81.9%	83.9%	81.8%
SM47_R 24 hr	22,686,756	81.2%	83.3%	84.4%	83.3%
IR64_0 hr	23,812,666	82.5%	81.2%	82.7%	81.2%
IR64_3 hr	23,019,410	77.8%	77.9%	79.5%	77.9%
IR64_24 hr	23,762,288	79.9%	81.9%	83.9%	81.9%
IR64_R 24 hr	22,917,540	79.6%	81.4%	82.8%	81.3%
HY15_0 hr	21,810,512	82.2%	81.2%	82.6%	81.1%
HY15_3 hr	21,984,248	79.8%	81.7%	83.5%	81.6%
HY15_24 hr	23,132,390	77.1%	78.7%	80.8%	78.6%
HY15_R 24 hr	23,724,834	80.5%	81.8%	83.2%	81.8%
TCN1_0 hr	23,115,034	83.8%	85.6%	86.5%	85.5%
TCN1_3 hr	23,551,718	80.1%	81.5%	78.6%	81.4%
TCN1_24 hr	23,571,526	79.6%	81.2%	82.6%	81.1%
TCN1_R 24 hr	23,666,160	83.7%	84.6%	85.6%	84.6%
Average	22,994,564	80.9%	81.8%	82.9%	81.7%

註：

MSU_CLC：以日本晴 (MSU rice 7.0) 為參考基因體且在 CLC bio 中操作；MSU_Tophat：以日本晴 (MSU rice 7.0) 為參考基因體且在 TopHat 中操作；9311_Tophat：以 9311 為參考基因體且在 TopHat 中操作；OsNB1_Tophat：以日本晴 (IRGSP-1.0) 為參考基因體且在 TopHat 中操作。0hr 為控制組，乾旱處理則是以 23.3% PEG 6000 模擬滲透壓 -0.6 Mpa 的乾旱逆境，將三葉齡水稻處理 3 小時 (3 hr)、24 小時 (24 hr) 以及處理 24 小時後回復 24 小時 (R 24 hr)。

表 2、RNA-Seq 序列片段以日本晴 mapping 的結果

Table 2. Mapping of RNA-Seq reads obtained from shoot samples of 5 indica rice genotypes into MSU rice 7.0 reference genome

		Raw reads	Mapped reads	Exon	Intron
0 hr	SM13	22,609,066	18,866,596	97.52%	2.48%
	SM47	21,978,228	18,157,834	97.56%	2.44%
	IR64	22,451,860	18,519,058	97.27%	2.73%
	HH15	23,979,662	19,701,264	97.13%	2.87%
	TCN1	23,303,096	19,533,752	97.22%	2.78%
3 hr	SM13	22,579,886	18,602,680	96.82%	3.18%
	SM47	22,234,400	17,458,326	97.67%	2.33%
	IR64	22,686,756	17,661,128	97.67%	2.33%
	HH15	23,812,666	19,006,806	97.62%	2.38%
	TCN1	23,019,410	18,444,366	97.64%	2.36%
24 hr	SM13	23,762,288	19,131,528	97.33%	2.67%
	SM47	22,917,540	18,337,756	96.93%	3.07%
	IR64	21,810,512	17,433,804	96.92%	3.08%
	HH15	21,984,248	16,942,854	97.07%	2.93%
	TCN1	23,132,390	18,403,850	97.70%	2.30%
R 24 hr	SM13	23,724,834	19,387,784	97.43%	2.57%
	SM47	23,115,034	18,774,004	97.51%	2.49%
	IR64	23,551,718	18,743,250	97.23%	2.77%
	HH15	23,571,526	18,967,954	97.29%	2.71%
	TCN1	23,666,160	19,816,698	97.20%	2.80%

註：

此為以日本晴 (MSU rice 7.0) 為參考基因體且在 CLC bio 中操作的定序結果。
 0 hr 為控制組，乾旱處理則是以 23.3% PEG 6000 模擬滲透壓 -0.6 Mpa 的乾旱逆境，將三葉齡水稻處理 3 小時 (3 hr)、24 小時 (24 hr) 以及處理 24 小時後回復 24 小時 (R 24 hr)。

表 3、SM47 與 HY15 在乾旱下正向調控的 DEGs (數值為以 \log_2 為底的比值 (乾旱處理/控制組))Table 3. List of up-regulated DEGs in SM47 and HY15 (the fold change is calculated as \log_2 (drought/control))

Feature ID	Annotation	SM47			IR64			HY15			TCN1		
		3hr	24hr	R 24hr									
LOC_Os07g44850.1	gibberellin receptor GID1L2	10.78	10.07	6.45	6.80	6.22	3.30	7.25	7.10	2.86	5.93	5.88	2.98
LOC_Os08g02030.1	transferase family protein	10.75	11.52	6.70	5.22	5.60	1.57	6.54	7.54	3.22	5.36	6.19	2.92
LOC_Os11g10590.1	expressed protein	6.94	6.90	2.03	5.83	5.44	1.51	6.49	6.95	2.34	7.56	6.27	1.72
LOC_Os03g61160.5	expressed protein	8.99	10.24	6.40	4.71	6.39	3.44	9.68	10.70	0.00	4.96	5.98	2.56
LOC_Os03g61160.2	expressed protein	7.50	7.50	3.27	4.79	5.24	3.26	11.01	12.11	0.00	4.93	5.37	4.47
LOC_Os05g35260.2	PB1 domain containing protein	10.93	10.10	0.00	2.64	1.83	-0.34	10.44	9.98	7.88	2.25	2.03	-1.94
LOC_Os11g19850.1	expressed protein	12.27	9.62	0.00	6.05	2.31	0.98	8.66	4.82	0.00	3.96	2.67	-1.02
LOC_Os01g50910.2	late embryogenesis abundant protein, group 3	12.19	12.73	0.00	11.82	12.62	0.00	11.12	11.55	0.00	4.25	4.43	-7.20
LOC_Os10g39110.1	expansin precursor	10.36	9.41	0.00	10.07	9.79	6.32	11.11	9.64	0.00	6.11	4.33	-4.68
LOC_Os12g32610.1	expressed protein	11.54	12.07	6.05	7.05	7.31	2.30	7.30	7.63	-4.40	6.73	5.22	1.98
LOC_Os02g26470.1	expressed protein	10.92	12.37	0.00	3.82	5.80	0.98	5.78	6.89	-5.22	5.53	6.87	0.98
LOC_Os07g34570.2	FAD dependent oxidoreductase domain containing protein	10.57	9.54	0.00	10.57	8.37	0.00	7.90	6.02	-3.74	10.30	9.00	0.00
LOC_Os02g57840.1	remorin C-terminal domain containing protein	12.58	12.38	0.00	5.09	5.06	-7.00	6.14	5.12	-6.33	12.04	11.91	0.00
LOC_Os06g44190.1	expressed protein	11.02	11.35	0.00	3.77	4.34	-6.47	5.54	4.39	-6.38	10.74	11.73	6.38
LOC_Os03g12890.5	aminotransferase domain containing protein	3.26	3.09	0.84	2.50	2.80	1.33	5.77	6.70	4.04	3.20	4.84	1.40
LOC_Os02g55890.1	inorganic H ⁺ pyrophosphatase	2.38	2.30	0.89	3.11	2.62	1.57	4.30	4.97	4.06	4.06	4.14	2.08
LOC_Os01g56070.1	RING finger protein	2.81	3.01	1.31	3.50	3.89	2.13	6.85	6.52	5.86	1.66	1.62	0.46
LOC_Os05g06970.1	peroxidase precursor	2.42	2.22	0.14	3.88	3.99	3.10	5.34	5.61	4.91	1.72	1.32	1.56
LOC_Os03g16020.1	HSP20/alpha crystallin family protein	4.86	3.11	0.08	5.40	2.89	0.47	9.81	7.27	3.51	4.25	3.01	0.06
LOC_Os04g52750.1	expressed protein	2.86	1.18	-1.27	4.32	2.09	-0.02	9.01	7.92	7.02	4.35	3.09	-0.02
LOC_Os02g49720.4	aldehyde dehydrogenase	1.59	1.66	0.36	2.36	2.06	1.60	6.89	7.75	6.13	2.48	2.91	-1.95
LOC_Os09g33930.3	farnesyltransferase/geranylgeranyltransferase type-1 subunitalpha	2.06	2.51	1.40	0.60	0.90	0.43	7.19	7.71	6.70	0.43	0.55	0.26

LOC_Os01g37200.1 retrotransposon protein, putative, Ty3-gypsy subclass	5.32	4.08	-0.05	5.35	3.49	0.42	8.92	7.02	3.30	0.00	0.00	0.00
LOC_Os03g07780.1 transposon protein, putative, unclassified	4.46	2.80	5.09	6.37	1.09	-2.79	9.33	6.08	1.05	0.44	2.55	0.98
LOC_Os10g19919.2 retrotransposon protein, putative, Ty3-gypsy subclass	6.94	5.34	-4.07	5.78	4.51	-1.02	11.06	9.90	6.59	6.74	5.17	2.79
LOC_Os03g53340.1 HSF-type DNA-binding domain containing protein	7.06	2.31	-1.05	4.58	1.75	-6.76	12.00	9.41	5.14	5.86	3.80	0.20
LOC_Os05g41490.1 circadian clock coupling factor ZGT	3.43	3.16	-1.31	3.98	4.09	-2.60	10.51	9.67	3.92	6.17	6.24	0.98
LOC_Os06g04480.1 expressed protein	1.85	1.88	-0.23	1.84	1.46	-0.28	11.13	10.56	0.00	6.00	5.22	2.30
LOC_Os01g06560.2 transcription factor HBP-1b	5.03	4.92	1.07	4.29	2.76	1.25	11.18	10.83	9.48	4.56	3.66	2.33
LOC_Os07g36544.2 serine/threonine-protein kinase receptor precursor	2.56	1.72	-0.20	2.24	2.37	1.26	10.47	10.50	8.93	2.39	2.62	1.27
LOC_Os04g57340.1 AP2 domain containing protein	3.38	2.39	-1.37	5.86	4.89	3.07	11.74	10.72	7.52	5.69	3.09	2.15
LOC_Os02g07760.2 aldehyde dehydrogenase	3.24	4.71	1.01	0.92	3.60	-1.62	11.02	13.28	0.00	2.52	3.37	-9.05
LOC_Os11g05170.1 expressed protein	9.46	12.03	0.00	2.77	5.37	0.57	10.07	10.91	6.82	8.54	9.99	6.34
LOC_Os04g43200.2 caleosin related protein	8.24	10.80	0.00	0.65	2.75	-2.02	10.62	10.62	7.44	9.61	9.72	0.00
LOC_Os06g32610.1 expressed protein	10.17	12.42	6.11	3.48	5.46	0.40	10.52	11.82	6.68	6.00	7.19	2.30
LOC_Os01g24710.4 jacalin-like lectin domain containing protein	5.02	6.26	2.57	4.29	6.02	2.57	11.94	14.23	9.67	4.73	7.50	3.91
LOC_Os10g31330.4 retrotransposon protein, putative, unclassified	2.12	3.84	2.27	2.72	3.09	2.43	9.63	10.28	10.79	9.37	7.48	9.00
LOC_Os09g02180.1 expressed protein	11.29	12.07	6.55	9.63	11.74	6.55	10.23	11.28	7.53	8.93	12.91	6.47
LOC_Os03g57900.1 zinc finger A20 and AN1 domain-containing stress-associated protein	2.41	2.60	0.03	2.26	2.46	0.46	2.62	2.58	1.25	2.10	1.97	0.43
LOC_Os07g49270.1 AMP deaminase	2.62	2.57	0.30	2.43	2.61	0.36	2.60	2.81	0.12	2.11	2.08	0.13
LOC_Os01g22352.1 peroxidase precursor	2.42	2.54	0.66	2.07	2.17	1.21	2.37	2.64	1.33	1.45	1.76	0.56
LOC_Os06g43640.2 Ser/Thr protein phosphatase family protein	2.14	2.11	0.10	1.94	2.02	0.28	2.00	2.44	0.45	1.83	2.43	0.38
LOC_Os03g16670.1 haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein	2.22	2.01	0.47	1.87	1.97	0.00	2.32	2.32	0.39	1.95	2.47	0.13
LOC_Os01g03914.2 cation efflux family protein	2.21	2.11	0.25	1.79	2.11	0.66	2.40	2.60	0.99	2.18	2.84	1.22
LOC_Os03g51390.1 expressed protein	2.66	2.40	-0.14	2.38	1.83	-0.22	3.52	3.26	0.10	2.48	1.72	0.43
LOC_Os11g06130.4 PHD-finger family protein	2.04	2.05	-0.42	1.76	1.63	-0.53	3.47	3.33	0.59	1.72	2.02	0.38
LOC_Os08g36440.1 HVA22	2.30	2.94	0.07	2.22	2.45	-0.82	3.43	3.18	0.90	2.54	2.95	0.61
LOC_Os03g06580.2 MTN26L2 - MtN26 family protein precursor	3.05	3.65	1.55	1.53	2.33	0.35	2.67	4.35	0.98	1.35	3.68	0.81
LOC_Os01g46580.1 actin-related protein 2/3 complex subunit 2	2.28	3.09	0.05	1.93	3.08	0.38	2.32	3.96	0.57	1.78	2.80	0.53

LOC_Os09g19650.1 3-ketoacyl-CoA synthase precursor	1.82	2.17	1.86	1.73	1.66	1.34	1.82	1.75	1.37	1.71	1.56	0.87
LOC_Os10g14011.1 expressed protein	1.72	1.51	1.37	1.50	1.52	1.13	1.68	1.64	1.30	1.03	1.59	0.66
LOC_Os07g26630.1 aquaporin protein	2.49	2.45	1.95	1.93	1.71	1.34	1.75	1.91	1.66	0.78	1.54	0.59
LOC_Os03g49350.1 lipoxygenase protein	2.26	1.63	1.32	2.09	1.62	1.19	1.52	1.72	1.79	1.56	1.59	-0.28
LOC_Os02g37610.1 expressed protein	0.90	2.06	1.25	0.62	2.00	0.92	1.10	2.13	1.68	0.61	1.70	0.90
LOC_Os04g52180.1 expressed protein	-0.11	2.08	0.16	0.88	1.65	0.64	1.55	3.20	1.01	1.29	1.50	0.90
LOC_Os01g04950.1 peptide transporter PTR2	4.68	3.84	1.54	3.19	2.80	1.26	4.30	4.04	2.08	3.03	3.15	-0.11
LOC_Os02g57840.2 remorin C-terminal domain containing protein	3.00	3.52	0.80	3.22	4.37	0.76	4.53	4.23	1.57	2.86	2.97	-0.02
LOC_Os06g37140.2 retrotransposon protein, putative, Ty3-gypsy subclass	3.72	3.31	0.04	2.73	2.04	-0.42	5.19	4.27	0.30	4.61	3.66	1.15
LOC_Os05g38290.2 protein phosphatase 2C	4.43	3.88	0.54	4.12	3.15	-1.60	4.59	3.63	-0.40	4.33	3.26	0.39
LOC_Os07g48830.1 glycosyl transferase 8 domain containing protein	2.79	2.55	-0.79	2.14	2.37	-0.44	3.11	3.22	-0.45	2.15	1.92	-0.97
LOC_Os06g09560.1 heat shock protein DnaJ	2.33	2.76	-1.31	1.51	2.37	-0.58	2.20	2.83	-0.11	1.65	1.42	-0.54
LOC_Os02g55134.1 cytochrome c oxidase copper chaperone	3.04	2.59	0.29	1.30	1.77	-0.56	2.82	2.00	-0.49	1.73	1.06	-0.65
LOC_Os12g13910.1 expressed protein	3.33	3.67	-0.69	2.28	2.37	-0.96	3.70	3.36	-0.53	2.92	2.52	-2.16
LOC_Os03g22120.2 sucrose synthase	4.69	4.94	2.61	2.94	3.02	1.47	2.29	2.88	1.00	2.07	2.42	1.16
LOC_Os01g16170.5 PQ loop repeat domain containing protein	4.01	4.30	2.65	2.18	2.87	1.48	2.29	3.14	1.97	1.52	2.36	1.23
LOC_Os08g44390.2 EF hand family protein	5.09	4.99	2.81	2.48	1.99	0.96	3.24	3.11	0.22	2.13	1.74	-0.17
LOC_Os05g10620.2 no apical meristem protein	5.51	5.52	3.83	2.91	2.22	1.18	3.82	4.17	2.51	2.03	0.66	0.45
LOC_Os06g41360.1 phosphoribosyl transferase	6.12	6.07	5.62	1.14	1.26	0.80	1.24	0.33	0.23	0.65	1.37	0.50
LOC_Os03g06850.1 B3 DNA binding domain containing protein	4.78	4.94	3.71	0.73	0.52	0.71	0.90	1.07	1.24	0.76	0.90	1.06
LOC_Os11g13620.1 expressed protein	4.05	5.98	4.95	0.81	1.09	0.72	0.31	1.90	1.19	1.54	2.67	2.28
LOC_Os02g28170.1 transferase family protein	7.28	7.83	3.48	4.98	4.26	1.57	1.85	2.07	0.78	1.56	1.85	0.43
LOC_Os05g02520.1 cupin domain containing protein	5.14	4.48	3.83	3.80	3.47	3.59	1.31	0.88	-0.62	0.69	1.45	-2.64
LOC_Os12g20390.5 expressed protein	6.01	6.35	7.49	1.29	0.09	-5.92	0.00	5.46	4.30	1.48	1.71	1.30
LOC_Os04g01810.1 terpene synthase	6.75	7.96	5.42	-3.85	3.09	1.57	0.00	0.00	0.00	0.00	5.86	12.10
LOC_Os03g52370.1 sulfate transporter	1.06	4.89	2.76	-5.13	5.87	2.30	2.86	3.59	1.05	4.03	5.94	4.62
LOC_Os05g04630.4 retrotransposon protein, putative, SINE subclass	8.18	7.71	0.00	0.00	8.34	0.00	-1.27	0.80	-6.68	3.16	2.84	0.56

LOC_Os11g05410.2	Ser/Thr protein phosphatase family protein	11.20	11.54	7.43	4.28	5.28	1.40	5.17	5.66	0.90	4.37	4.67	1.68
LOC_Os07g43604.1	expressed protein	9.55	10.65	6.57	4.65	5.61	3.35	3.52	4.91	1.19	3.97	4.75	2.46
LOC_Os04g52450.2	aminotransferase	8.96	9.71	7.70	3.26	2.29	1.12	4.47	3.93	0.21	4.54	3.73	1.93
LOC_Os01g06640.3	basic helix-loop-helix	11.08	11.76	10.05	2.83	3.78	2.00	4.31	4.90	3.76	3.71	4.37	3.18
LOC_Os07g40220.1	expressed protein	9.79	9.35	9.06	4.07	2.82	3.10	3.41	3.47	3.48	2.64	2.85	1.24
LOC_Os02g09310.1	cytochrome P450	9.88	10.89	7.80	3.79	4.67	0.98	7.04	6.62	5.46	4.44	4.89	2.30
LOC_Os02g48340.1	RNA recognition motif containing protein	10.29	10.26	8.21	1.88	1.92	1.28	6.80	6.29	4.96	2.56	2.25	0.25
LOC_Os12g24020.1	rhodanese-like domain containing protein	9.42	9.03	6.60	4.93	4.48	-3.81	2.62	2.97	1.34	2.62	2.73	1.77
LOC_Os03g35750.1	expressed protein	12.09	9.93	5.90	4.29	2.20	0.40	4.88	3.22	0.79	0.00	0.00	0.00
LOC_Os02g54820.1	trehalose-6-phosphate synthase	10.86	11.08	0.00	1.53	0.82	-1.67	3.04	3.03	-0.78	4.39	4.90	1.42
LOC_Os06g46900.2	phosphosulfolactate synthase-related protein	6.45	9.42	4.95	0.46	3.29	0.00	1.80	4.41	0.43	0.16	4.99	2.08
LOC_Os01g04380.1	HSP20/alpha crystallin family protein	8.93	12.26	4.66	1.88	5.98	-1.02	2.44	3.92	0.05	5.04	9.27	6.16
LOC_Os02g09600.1	expressed protein	11.53	12.31	12.02	0.83	0.98	1.27	0.05	0.27	-1.06	-0.41	0.03	-0.92
LOC_Os09g35830.2	RNA recognition motif containing protein	9.35	10.12	8.43	-0.13	0.57	0.41	-0.05	0.54	-1.29	1.93	2.48	1.79
LOC_Os12g02660.2	expressed protein	11.29	9.03	10.77	2.49	1.12	0.04	1.14	0.02	0.38	8.07	6.78	0.00
LOC_Os03g20500.1	OsFBX82 - F-box domain containing protein	1.41	0.59	1.15	1.62	0.63	1.13	1.96	0.95	1.43	1.58	0.76	0.89
LOC_Os06g50900.1	expressed protein	1.08	0.99	1.43	1.26	0.85	0.81	0.89	0.77	1.51	0.67	0.83	0.43
LOC_Os12g44110.1	ligA	0.60	-0.43	1.03	0.80	-0.02	1.21	1.30	0.38	1.32	0.80	-0.48	0.36
LOC_Os03g38540.1	folic acid binding protein	2.08	0.19	1.28	1.53	-0.46	0.02	1.84	0.24	1.50	2.41	0.35	0.93
LOC_Os11g39220.1	acyl-coenzyme A oxidase	1.84	1.33	0.01	1.22	1.17	0.11	1.46	1.46	0.31	0.74	1.09	0.75
LOC_Os11g04104.3	major facilitator superfamily antiporter	1.18	0.54	-0.51	0.93	0.54	-0.76	1.39	0.73	-0.38	1.11	0.61	-0.58
LOC_Os09g37330.1	OsSAUR39 - Auxin-responsive SAUR gene family member	-0.45	1.71	1.51	-0.75	0.98	1.30	-0.15	1.28	1.61	-1.17	0.93	0.99
LOC_Os01g07890.1	expressed protein	0.01	0.88	1.38	-0.79	0.89	0.98	-0.11	1.04	1.46	-0.04	0.87	1.13
LOC_Os03g16430.1	RNA polymerase sigma factor	-0.57	-0.09	1.31	-0.21	0.30	1.24	-0.55	0.07	1.43	-0.65	0.14	0.96
LOC_Os02g20040.1	loricrin	0.01	0.81	1.27	-0.74	0.23	0.93	-0.10	0.37	1.25	-0.75	-0.98	0.11
LOC_Os07g04190.1	receptor protein kinase CLAVATA1 precursor	-1.23	-1.25	1.13	-1.08	-1.30	0.85	-0.48	-0.89	1.39	-1.20	-0.37	0.60
LOC_Os03g61910.2	retrotransposon protein, putative, unclassified	-0.09	-1.24	2.66	-2.87	0.47	2.23	-1.35	0.68	2.29	-8.27	-8.27	1.44

表 4、顯著正向與負向調控之 DEGs 參與之代謝路徑

Table 4. List of significant enriched pathways which up- and down-regulated DEGs involved in

Pathway Term	Pathway ID	Input number	Background number	P -Value	Q -Value
Nitrogen metabolism	dosa00910	18	35	0.00	0.08
Carbon fixation in photosynthetic organisms	dosa00710	26	73	0.00	0.23
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	dosa00630	21	56	0.01	0.23
Carbon metabolism	dosa01200	54	202	0.01	0.31
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	dosa00250	16	44	0.02	0.31
alpha-Linolenic acid metabolism	dosa00592	13	33	0.02	0.31
Pentose phosphate pathway	dosa00030	16	46	0.03	0.31
Photosynthesis	dosa00195	17	50	0.03	0.31
Linoleic acid metabolism	dosa00591	7	14	0.04	0.31
Cutin, suberine and wax biosynthesis	dosa00073	7	14	0.04	0.31
Biosynthesis of secondary metabolites	dosa01110	160	738	0.04	0.31
Butanoate metabolism	dosa00650	10	25	0.04	0.31
Biosynthesis of unsaturated fatty acids	dosa01040	13	37	0.04	0.31
Fatty acid degradation	dosa00071	14	41	0.04	0.31
Glycolysis / Gluconeogenesis	dosa00010	31	115	0.04	0.31

註:

Input number: DEGs 中參與此代謝途徑的基因數量

Background number: 資料庫中此代謝途徑的所有基因數量

表 5、SM47 的點突變分布情形

Table 5. The distribution of point mutations exsisted in SM47

Region	SNP
5' UTR	1
3' UTR	4
Intron	4
Non synonymous coding	9
Synonymous coding	6
Early stop gained	1



表 6、SM47 中候選突變基因的定位結果

Table 6. List of candidate genes that SNP identified in SM47

Trancript_ID	SNP	Type	Annotation	change in aa.	IR64			SM13			SM47			HY15			TCN1		
					3hr	24hr	R24hr	3hr	24hr										
LOC_Os03g53550	G→A	3' UTR	retrotransposon protein		0.00	0.00	0.00	-7.79	-7.79	-7.79	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
LOC_Os08g02050	G→A	3' UTR	protein kinase family protein		-0.12	-0.22	-0.06	0.99	0.89	0.93	0.01	-0.05	0.03	0.29	0.26	0.11	0.09	0.18	-0.08
LOC_Os06g25950	G→T	3' UTR	expressed protein		-0.74	-0.40	0.35	6.99	6.72	9.32	-0.12	-0.47	0.71	-0.03	-0.63	1.24	0.53	-0.33	1.11
LOC_Os11g03540	G→C	3' UTR	AP2 domain containing protein		-1.93	-1.18	-0.90	5.77	6.31	8.13	-1.40	-0.67	0.58	-3.12	-0.63	-0.31	-0.39	-1.59	-0.11
LOC_Os12g42610	A→G	5' UTR	YABBY domain containing protein		-0.25	-0.14	0.14	2.44	2.41	2.72	-0.18	-0.12	0.42	-0.49	-0.45	-0.05	-0.49	0.03	0.39
LOC_Os10g12480	C→T	Stop gained	transposon protein, En/Spm	Q/*	-0.64	-0.38	-0.73	7.35	6.21	7.51	-1.08	0.61	0.19	-0.05	0.12	0.40	0.33	0.60	0.87
LOC_Os11g03190	C→A	Non synonymous coding	expressed protein	G/V	-4.79	-4.79	0.98	0.00	5.74	4.72	5.87	4.80	0.00	5.75	4.91	0.00	5.15	0.00	0.00
LOC_Os07g09590	C→T	Non synonymous coding	bHLH transcription factor	A/T	-0.93	0.09	0.98	7.62	6.76	8.74	-0.94	-0.34	-0.05	-0.12	-0.95	0.47	-0.78	-1.40	-0.24
LOC_Os06g10690	C→T	Non synonymous coding	PHD-finger domain containing protein	V/M	-0.04	-0.09	-0.26	1.26	0.94	0.79	0.03	0.03	-0.11	-0.26	-0.28	-0.28	-0.30	-0.03	-0.17
LOC_Os10g24004	C→T	Non synonymous coding	expressed protein	R/Q	2.07	2.26	2.57	7.78	9.40	9.21	0.83	0.64	2.10	0.00	4.88	4.72	0.00	0.00	0.00
LOC_Os04g41640	G→A	Non synonymous coding	HEV2 - Hevein family protein precursor	A/V	2.06	3.84	3.48	9.04	11.35	9.85	1.23	3.29	1.81	2.29	3.49	1.53	2.45	3.87	3.52
LOC_Os04g43140	A→C	Non synonymous coding	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase	L/W	-0.73	-0.27	0.21	0.11	0.27	0.41	-0.71	-0.24	0.14	-0.71	-0.54	-0.06	-0.97	-1.08	-0.17
LOC_Os05g49610	G→A	Non synonymous coding	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	V/M	-0.17	-0.55	0.36	8.73	8.82	8.93	-0.08	-0.18	0.59	-0.22	-0.54	0.30	-0.24	-0.48	0.24
LOC_Os06g48500	C→T	Non synonymous coding	expressed protein	A/V	1.08	1.56	1.54	2.77	3.40	3.26	1.06	1.27	0.50	1.39	1.65	1.82	1.32	1.32	1.20
LOC_Os04g49940	G→A	Non synonymous coding	expressed protein	S/N	0.04	0.27	1.17	-0.18	0.12	-0.19	0.26	0.14	0.66	0.15	-0.38	0.21	0.18	-0.27	0.39

註:

數值為以 \log_2 為底的比值 (乾旱處理/控制組)

表 7、TCN1 在乾旱下獨特負向調控的 DEGs (數值為以 \log_2 為底的比值 (乾旱處理/控制組))Table 7. List of TCN1 specific down-regulated DEGs (the fold change is calculated as \log_2 (drought/control))

Feature ID	Annotation	3hr	24hr	R	24hr	Feature ID	Annotation	3hr	24hr	R	24hr
LOC_Os04g35520.1	OsAPx7	-12.05	-2.51	-2.23	LOC_Os05g11064.1	expressed protein	-7.41	-7.41	-7.41	-7.41	
LOC_Os03g48940.3	chloride channel protein CLC-d	-10.85	-0.66	-0.68	LOC_Os09g32510.2	BHLH transcription factor	-7.40	-1.22	0.60		
LOC_Os08g06110.4	MYB family transcription factor	-10.80	-0.23	-10.80	LOC_Os07g44670.1	retrotransposon protein	-7.28	-4.37	-1.31		
LOC_Os03g16070.2	expressed protein	-10.10	-2.55	-0.23	LOC_Os08g06800.1	retrotransposon protein	-7.27	-7.27	-7.27	-7.27	
LOC_Os12g20390.1	expressed protein	-9.54	-9.54	-9.54	LOC_Os12g01290.1	ulp1 protease family protein	-7.24	-7.24	-7.24	-7.24	
LOC_Os09g06950.1	expressed protein	-9.38	-9.38	-9.38	LOC_Os11g14160.1	transposon protein, Pong sub-class	-7.20	-7.20	-7.20	-7.20	
LOC_Os01g33615.1	expressed protein	-8.98	-8.98	-8.98	LOC_Os03g59774.1	expressed protein	-7.18	-7.18	-7.18	-7.18	
LOC_Os02g11705.1	expressed protein	-8.71	-2.50	0.79	LOC_Os11g07980.1	ion channel nompc	-7.05	-7.05	-7.05	-7.05	
LOC_Os08g15149.1	oxidoreductase, 2OG-Fe oxygenase family protein	-8.64	-4.08	-1.87	LOC_Os03g47050.1	expressed protein	-7.04	-7.04	-7.04	-7.04	
LOC_Os04g40630.1	BTBZ4	-8.62	-2.64	-0.48	LOC_Os08g30370.1	expressed protein	-6.99	-6.99	-6.99	-6.99	
LOC_Os08g25050.1	PIF-like orf1	-8.62	-8.62	-8.62	LOC_Os02g20890.1	transposon protein, Mutator sub-class	-6.90	-6.90	-6.90	-6.90	
LOC_Os02g37800.1	lecithin:cholesterol acyltransferase	-8.55	-8.55	-8.55	LOC_Os09g17920.1	transposon protein, CACTA, En/Spm sub-class	-6.89	-6.89	-6.89	-6.89	
LOC_Os11g11940.1	MLA10	-8.35	-8.35	-8.35	LOC_Os12g35465.1	expressed protein	-6.79	-6.79	-6.79	-6.79	
LOC_Os01g02560.1	Ser/Thr receptor-like kinase	-8.31	-8.31	-8.31	LOC_Os01g09370.1	ankyrin repeat domain-containing protein 28	-6.62	-6.62	-6.62	-6.62	
LOC_Os03g61910.2	retrotransposon protein	-8.27	-8.27	1.44	LOC_Os10g19970.1	expressed protein	-6.24	-6.24	-6.24	-6.24	
LOC_Os11g11950.1	disease resistance protein RPM1	-8.14	-8.14	-8.14	LOC_Os08g23200.1	transposon protein, Ac/Ds sub-class	-6.12	-6.12	-6.12	-6.12	
LOC_Os11g35274.1	protein kinase domain containing protein	-8.08	-4.91	-8.08	LOC_Os10g05810.1	transposon protein, Mutator sub-class	-6.04	-6.04	-6.04	-6.04	
LOC_Os09g11160.1	expressed protein	-7.79	-7.79	-7.79	LOC_Os08g06210.1	expressed protein	-6.01	-6.01	-6.01	-6.01	
LOC_Os10g24094.2	expressed protein	-7.77	-7.77	-7.77	LOC_Os12g36750.1	expressed protein	-5.87	-0.50	-2.61		
LOC_Os11g14150.1	transposon protein, Pong sub-class	-7.76	-7.76	-7.76	LOC_Os12g16290.1	isoflavone reductase	-5.41	-5.41	-2.61		
LOC_Os11g39660.1	transposon protein, Ac/Ds sub-class	-7.65	-7.65	-7.65	LOC_Os10g02880.1	O-methyltransferase	-5.37	-5.37	-5.37	-5.37	
LOC_Os06g19200.1	expressed protein	-7.64	-7.64	-7.64	LOC_Os11g10570.1	NBS-LRR disease resistance protein	-4.51	-4.87	-7.99		
LOC_Os08g09610.1	expressed protein	-7.56	-3.37	-7.56	LOC_Os08g28010.1	expressed protein	-4.31	-7.96	-7.96	-7.96	
LOC_Os04g40180.1	expressed protein	-7.41	-7.41	-7.41	LOC_Os04g24220.1	OsWAK32 - OsWAK receptor-like protein kinase	-4.09	-3.57	-9.79		
LOC_Os03g03120.1	transposon protein, Mutator sub-class	-7.41	-7.41	-7.41	LOC_Os09g12050.1	retrotransposon protein	-2.37	-6.89	-6.89	-6.89	

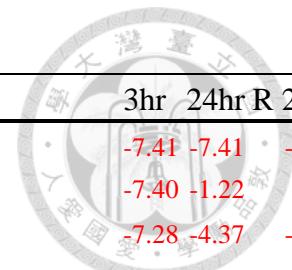


表 8、水稻已知耐旱相關基因

Table 8. List of drought related genes that have known in rice

Feature ID	Annotation	IR64				SM47				HY15				TCN1			
		3hr	24hr	R 24hr	3hr	24hr	R 24hr	3hr	24hr	R 24hr	3hr	24hr	R 24hr	3hr	24hr	R 24hr	
LOC_Os02g50350.1	dihydroorotate dehydrogenase protein	2.54	2.07	-0.10	2.87	1.99	-0.45	2.88	2.47	0.28	2.56	2.34	0.43				
LOC_Os04g57950.1		-0.50	-0.78	-0.27	-0.87	-1.03	-0.31	-0.74	-1.00	-0.56	-0.76	-1.66	-0.04				
LOC_Os02g51770.2		0.46	-9.42	0.56	-9.59	-9.59	0.04	1.65	0.28	-0.74	-1.08	-0.06	-1.01				
LOC_Os02g51770.5	TLD family protein	-0.03	0.83	-0.35	2.68	2.43	2.69	-2.67	-0.52	-0.01	0.10	0.26	0.17				
LOC_Os12g06100.1		0.12	0.33	-0.07	0.56	0.33	0.00	-0.09	0.11	-0.18	-0.10	0.12	-0.20				
LOC_Os07g46990.2	copper/zinc superoxide dismutase	2.82	3.76	-0.43	3.96	4.89	2.83	2.79	4.18	0.97	1.35	3.13	-8.77				
LOC_Os03g11960.3		1.89	2.24	0.53	-1.40	-0.67	-0.46	0.36	-1.34	-0.62	0.47	0.86	0.98				
LOC_Os04g48410.1	copper chaperone for superoxide dismutase	0.64	0.67	-0.17	0.81	0.85	0.20	1.23	1.06	0.08	0.96	0.86	0.07				
LOC_Os05g25850.1	superoxide dismutase, mitochondrial precursor	1.31	1.01	0.49	0.98	0.66	-0.62	1.91	2.07	0.21	1.42	1.02	0.09				
LOC_Os06g05110.2	superoxide dismutase, chloroplast	1.09	1.67	1.34	0.90	1.96	0.74	1.13	2.07	1.15	0.08	0.73	0.05				
LOC_Os02g41860.2		-0.11	-0.79	0.29	-0.04	-0.90	0.73	-0.16	-1.04	0.07	-0.25	-0.58	-0.12				
LOC_Os02g44630.1		-12.56	-12.56	-12.56	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	13.17	0.00			
LOC_Os02g44630.2		0.13	0.24	0.62	0.52	0.71	0.97	0.23	0.23	0.76	0.44	0.68	0.37				
LOC_Os02g44630.3	aquaporin protein	2.42	1.48	1.79	1.02	0.08	0.96	1.54	0.43	0.96	0.41	-0.46	0.41				
LOC_Os02g51110.1		0.78	-0.09	0.57	0.41	0.23	0.92	0.57	-0.46	0.53	0.16	-0.04	0.47				
LOC_Os05g14240.1		-0.26	-0.51	0.52	0.78	1.11	1.10	1.21	1.24	0.85	0.63	0.51	0.58				
LOC_Os07g26630.1		1.93	1.71	1.34	2.49	2.45	1.95	1.75	1.91	1.66	0.78	1.54	0.59				
LOC_Os10g35050.1		5.09	7.08	1.79	10.70	12.13	4.10	10.71	13.22	7.25	9.44	11.01	6.34				
LOC_Os11g03300.1	NAC domain transcription factor	4.72	5.19	1.85	5.28	5.18	1.87	4.12	4.50	1.84	4.00	4.65	1.71				
LOC_Os05g34830.3		3.74	2.67	0.57	4.05	3.85	-1.37	4.87	3.56	1.34	4.52	3.97	1.56				
LOC_Os12g03040.1	No apical meristem protein	2.89	3.28	0.40	3.69	3.74	0.57	3.29	3.41	1.32	3.13	3.52	0.91				
LOC_Os05g10620.2		2.91	2.22	1.18	5.51	5.52	3.83	3.82	4.17	2.51	2.03	0.66	0.45				
LOC_Os02g36880.1		1.36	1.69	0.22	3.04	2.89	1.72	1.96	2.19	0.42	2.73	2.56	1.42				

註: 僅列出部分在材料間表現差異較多的基因，並且每個基因至少在一種材料中的表現量總和 RPKM ≥ 15 。數值為以 \log_2 為底的比值 (乾旱處理/控制組)。



圖 1、耐旱水稻之功能基因體學研究與品種育成計畫

Figure 1. Breeding of drought-resistant rice varieties through genomics strategies

計畫內容包含四個子計畫，分別為 (1) 分子標幟輔助耐旱水稻之選育 (2) 水稻耐旱基因之定位選殖與功能研究 (3)耐旱水稻生理反應、機制和代謝產物之研究 (4) 以次世代定序進行轉錄體研究來探討水稻耐旱機制。

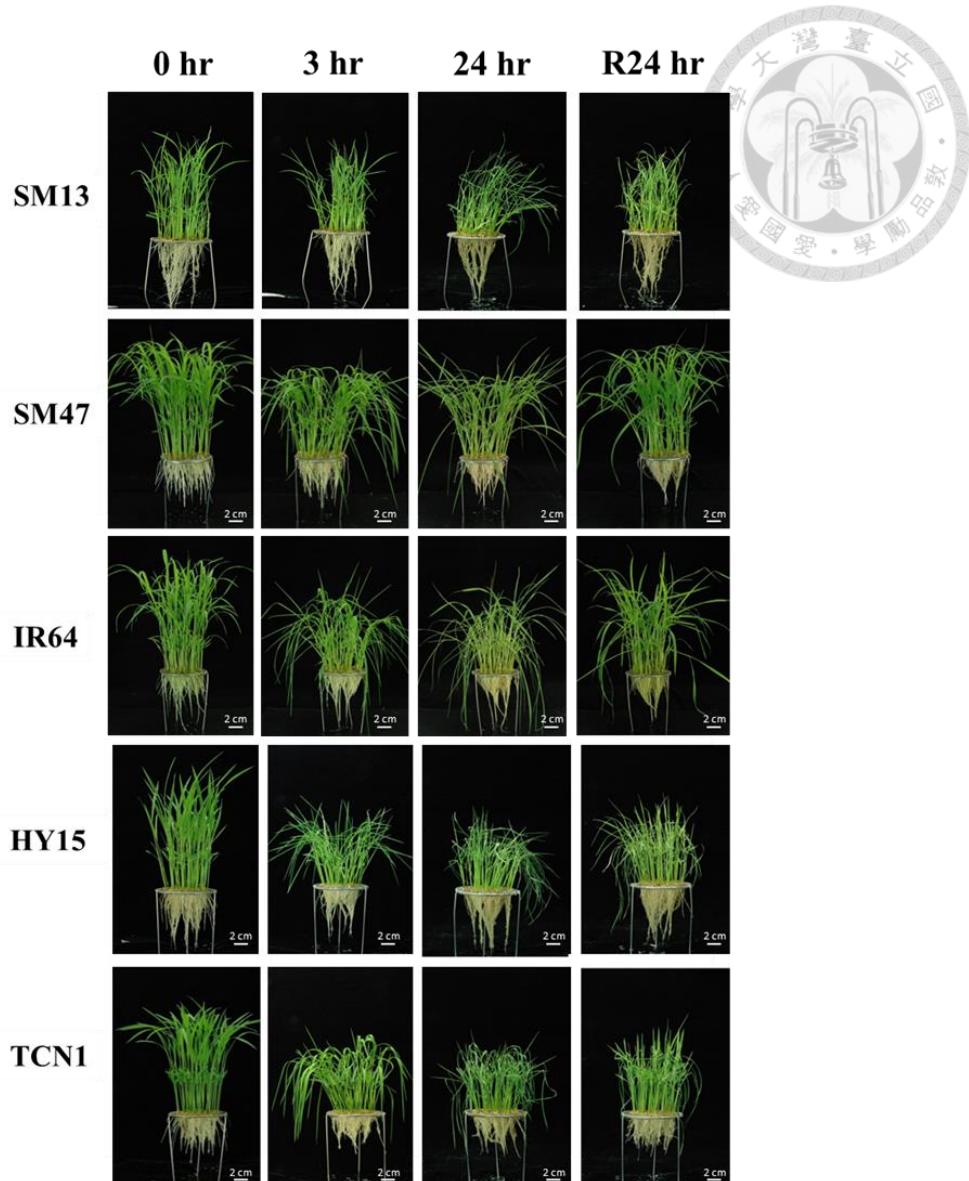


圖 2、五種稻在乾旱處理下之外表形態

Figure 2. Phenotypes of 5 indica rice genotypes during drought treatments

乾旱條件為 23.3% PEG 6000 處理 3 小時 (3 hr)、24 小時 (24 hr) 以及乾旱 24 小時後回復正常水耕液 24 小時 (R 24 hr)。與控制組比較，IR64 與突變系處理 3 hr 後可以看出莖稈倒伏傾斜程度不一，以 IR64 傾斜幅度最大，SM47 次之，而 SM13 變化最少。24 hr 處理後，IR64 除了莖稈倒伏嚴重，葉片從尖端開始捲曲且葉面積縮小幅度最明顯；R 24 hr 可以發現 IR64 長出些許嫩綠的新葉，然而捲曲萎凋的老葉仍佔大部分。至於 HY15 以及 TCN1 在乾旱處理後的形態差異較不明顯，不過在根系方面，HY15 的根長均比 TCN1 的長，可能有助於長時間缺水逆境下的水分吸收能力。值得特別注意的是，SM13 雖然較不受乾旱逆境影響生長，擁有明顯的耐受特性，然而它在正常情況下的生長勢較弱。

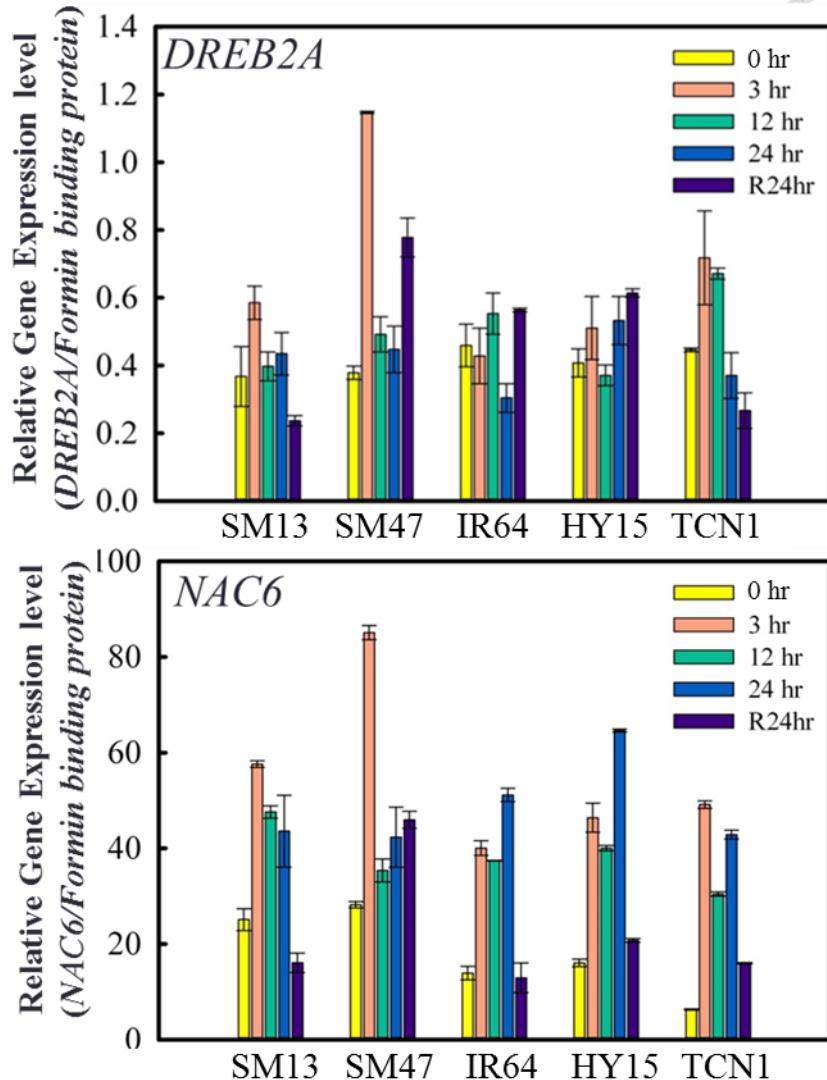


圖 3、即時聚合酶連鎖反應 (Real-time PCR) 分析乾旱相關基因之表現量

Figure 3. Quantification of transcripts of drought related genes by real-time RT-PCR

本實驗挑選乾旱調控相關的轉錄因子 *OsDREB2A* 以及 *OsNAC6*，以及選擇調控細胞骨架的 formin protein 作為內部對照，偵測兩者在樣品遭遇乾旱逆境下的基因表現量，乾旱處理的時間點包括 3、12、24 小時以及復水 24 小時。*OsDREB2A* 在逆境下的變化以 SM47 最明顯，在乾旱 3 小時的表現量以 SM47 為最高，其次為 TCN1、SM13 以及 HY15 的 *OsDREB2A*，而 IR64 却不增反減。隨著乾旱時間增加 *OsDREB2A* 的表現量也趨於平常狀態，然而在復水階段，SM47 的表現量又上升約 1 倍，IR64 及 HY15 也輕微增加。*OsNAC6* 在逆境下的變化也以 SM47 最明顯，與 SM13 及 TCN1 同樣在 3 小時的表現量達最高，不過只有 SM47 在復水期的表現量為次之，而 IR64 及 HY15 則是在乾旱 24 小時達最高。

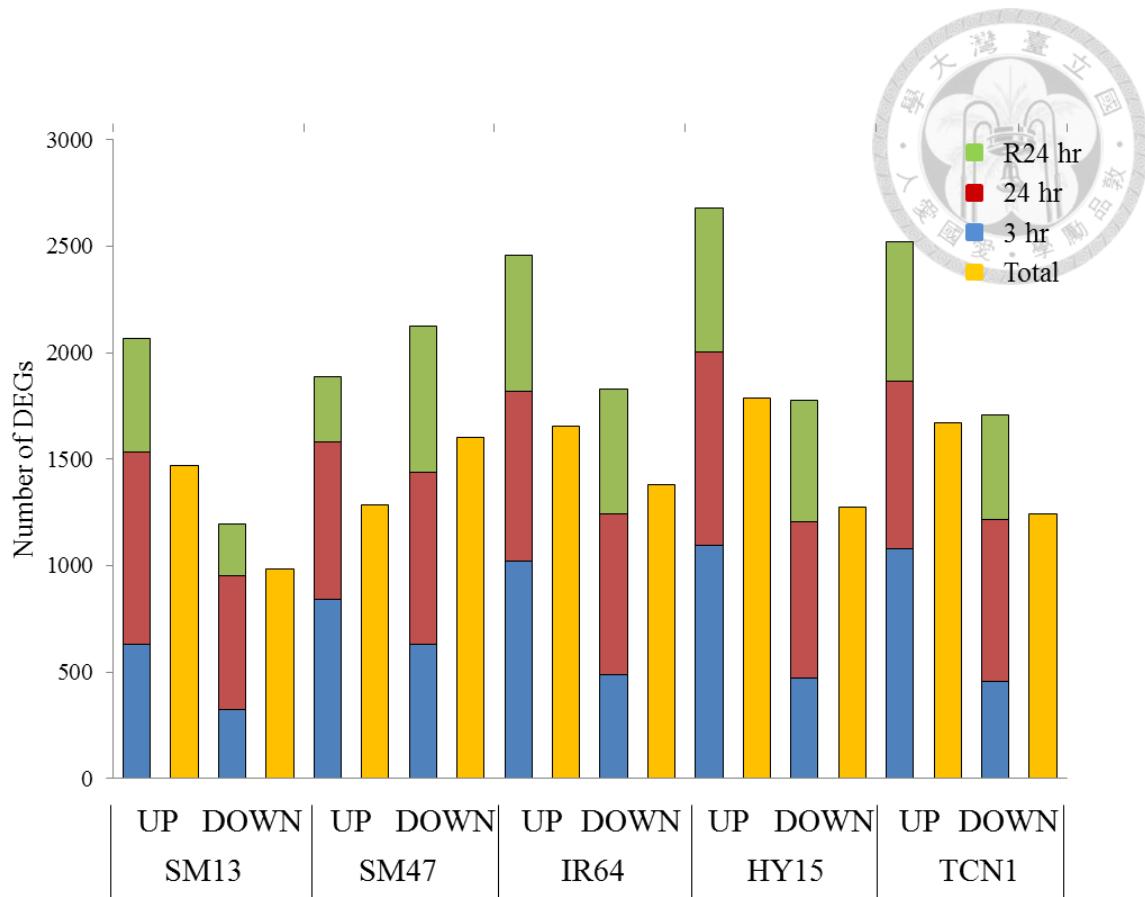


圖 4、SM13、SM47、IR64、HY15 與 TCN1 中正向及負向調控之差異表現基因 (DEGs) 的數量變化

Figure 4. Number of up- and down-regulated DEGs in SM13, SM47, IR64 and TCN1

DEGs 的篩選條件為處理組與控制組之比值取 $\log_2 \geq 1$ 或 ≤ -1 ，且設定顯著標準為 $p\text{-value} \leq 0.05$ 。3 hr、24 hr 以及 R 24 hr 表示秈稻在 PEG 乾旱處理 3 hr、24 hr 以及 R 24 hr 下的基因數量；all 則為三者取聯集，表示至少在一種處理時期有顯著差異的基因數量。

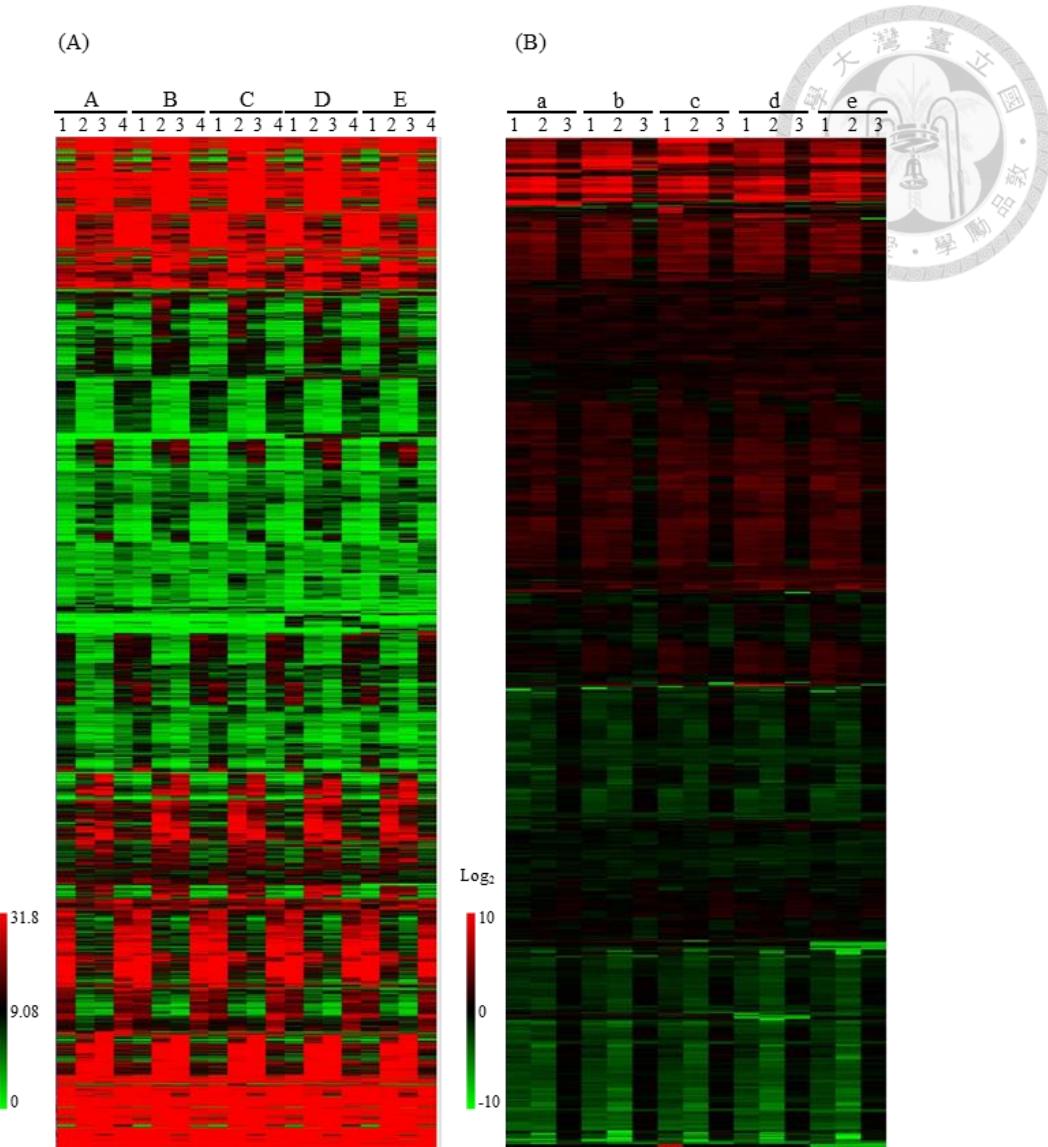


圖 5、5 種稻在乾旱下的 DEGs 表現量分群分析

Figure 5. Hierarchical cluster analysis of DEGs under drought treatments in 5 indica rice

Heatmap 包含 3263 個 DEGs 在乾旱下的基因表現, DEGs 的篩選條件為處理組與控制組之比值取 $\log_2 \geq 1$ 或 ≤ -1 , 並設定顯著標準為 $p\text{-value} \leq 0.05$, 且為避免篩選到表現量過低的基因, 每個基因至少在一種材料中的表現量總和 $\text{RPKM} \geq 15$ 。(A) 數值為原始基因表現量, A、B、C、D 以及 E 分別表示 IR64、SM13、SM47、HY15 以及 TCN1；1、2、3 以及 4 則表示在 0 hr、3 hr、24 hr 以及復水 24 hr 的時間點；(B) 數值為 \log_2 為底的比值 (乾旱處理/控制組), a、b、c、d 以及 e 分別表示 IR64、SM13、SM47、HY15 以及 TCN1。1、2 以及 3 則表示在 3 hr、24 hr 以及復水 24 hr 的時間點。所有基因排列順序皆以階層式分群法 (hierarchical clustering) 分析基因表現趨勢。

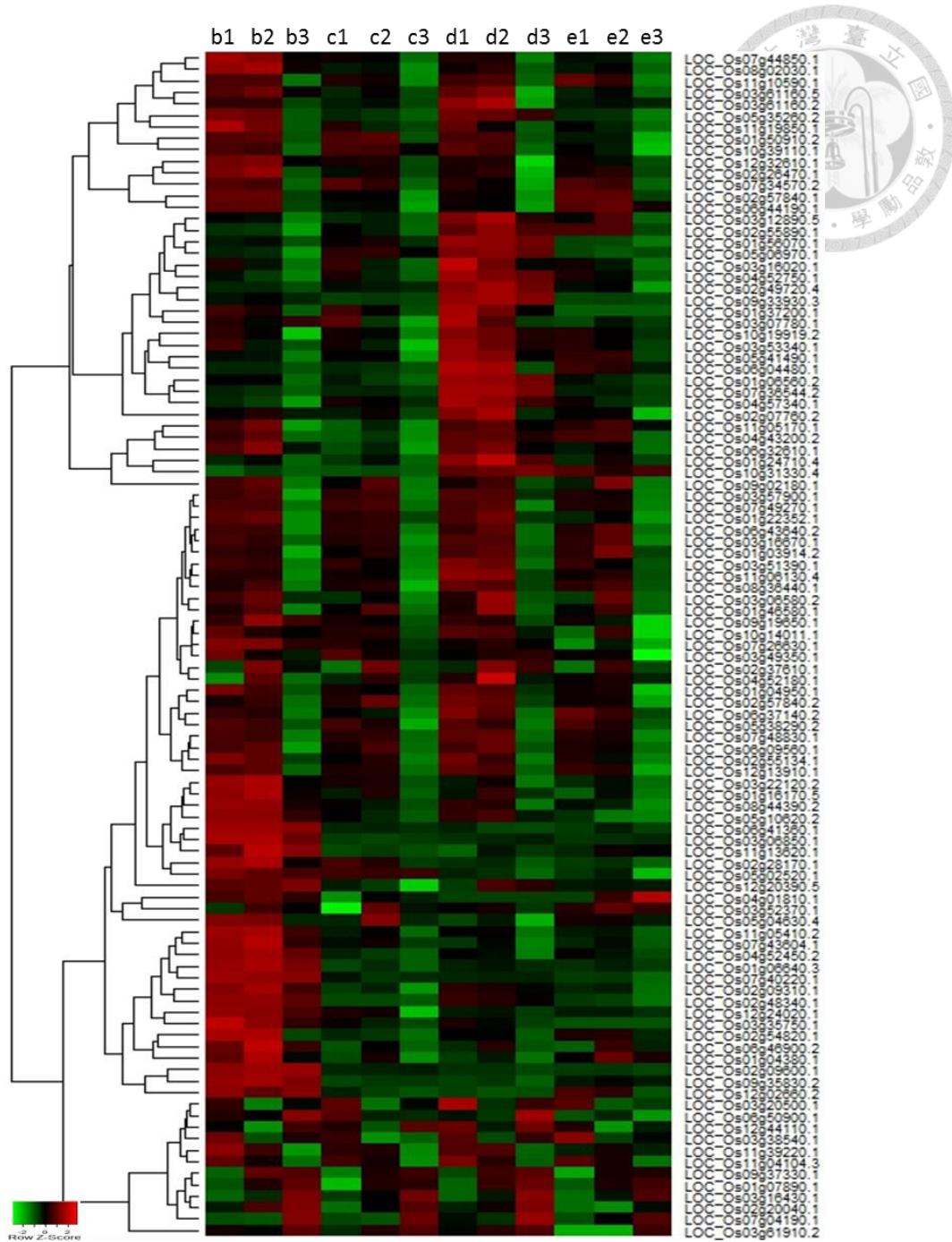


圖 6、SM47 與 HY15 在乾旱下正向調控的 DEGs 之分群分析

Figure 6. Hierarchical cluster analysis of up-regulated DEGs in SM47 and HY15

用 heatmap 將 DEGs 表現量趨勢分群 (圖 5) 後挑出 SM47 相對於 IR64 或者 HY15 相對於 TCN1 有差異的基因群，結果一共列出 103 個基因，其中一共有 26 個 expressed protein 以及 17 個非生物逆境刺激相關基因。數值為 \log_2 為底的比值 (乾旱處理/控制組)，b、c、d 以及 e 分別表示 SM47、IR64、HY15 以及 TCN1。1、2 以及 3 則表示在 3 hr、24 hr 以及復水 24 hr 的時間點，數值皆為處理組與控制組的 \log_2 foldchange。所有基因排列順序皆以階層式分群法 (hierarchical clustering) 分析基因表現趨勢。

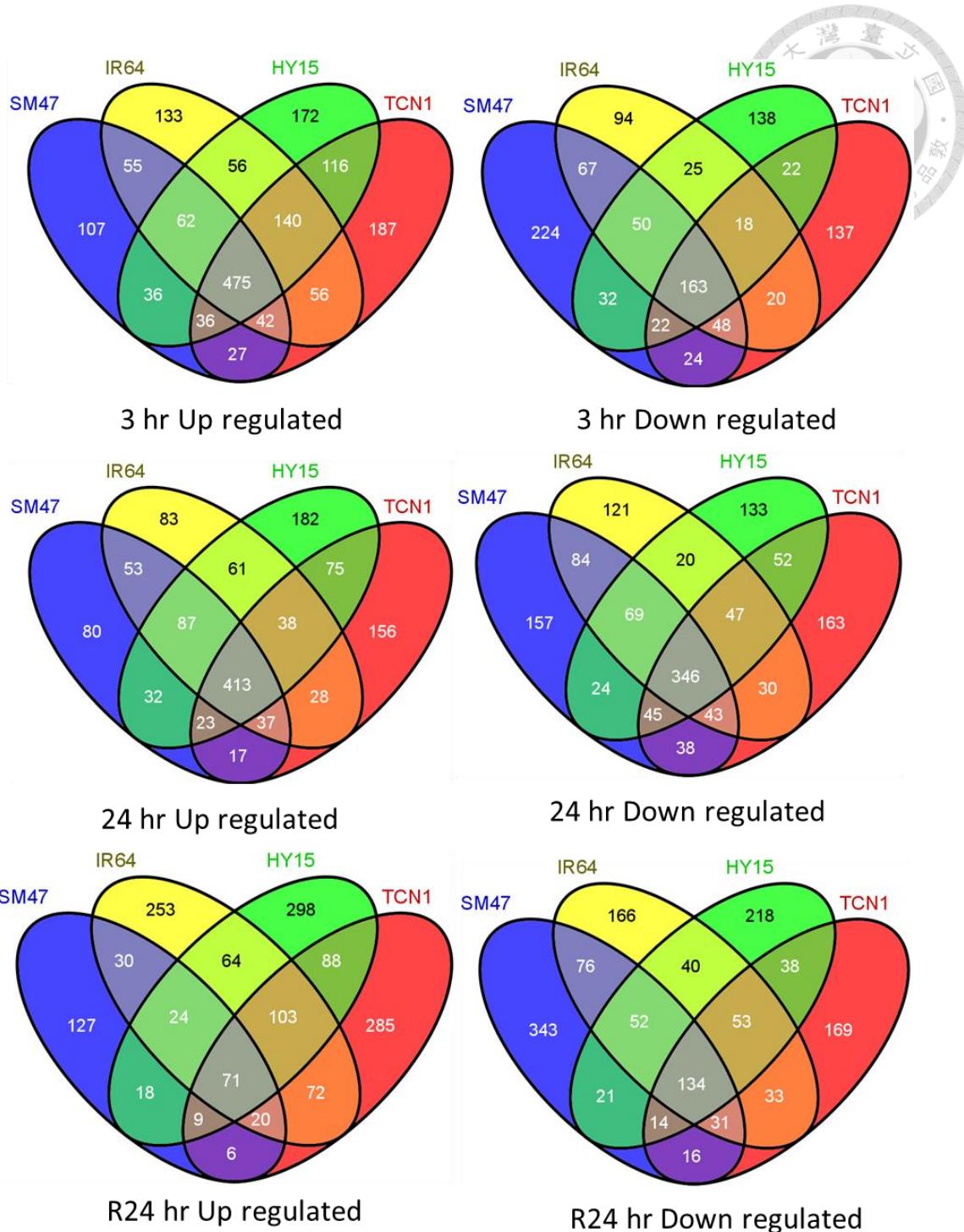


圖 7、以 venn diagram 分析 SM47、IR64、HY15 與 TCN1 在乾旱處理下的 DEGs

Figure 7. Venn diagrams of DEGs during drought treatments in SM47, IR64, HY15 and TCN1

DEGs 的篩選標準為處理組與控制組之比值取 $\log_2 \geq 1$ 且 $p\text{-value} \leq 0.05$ 。

從數量多寡來觀察，可以發現四者共通的正向調控基因以 3 hr 為最多，其次為 24 hr 與 R 24 hr，而負向調控基因以 24 hr 為最多，其次為 3 hr 與 R 24 hr。

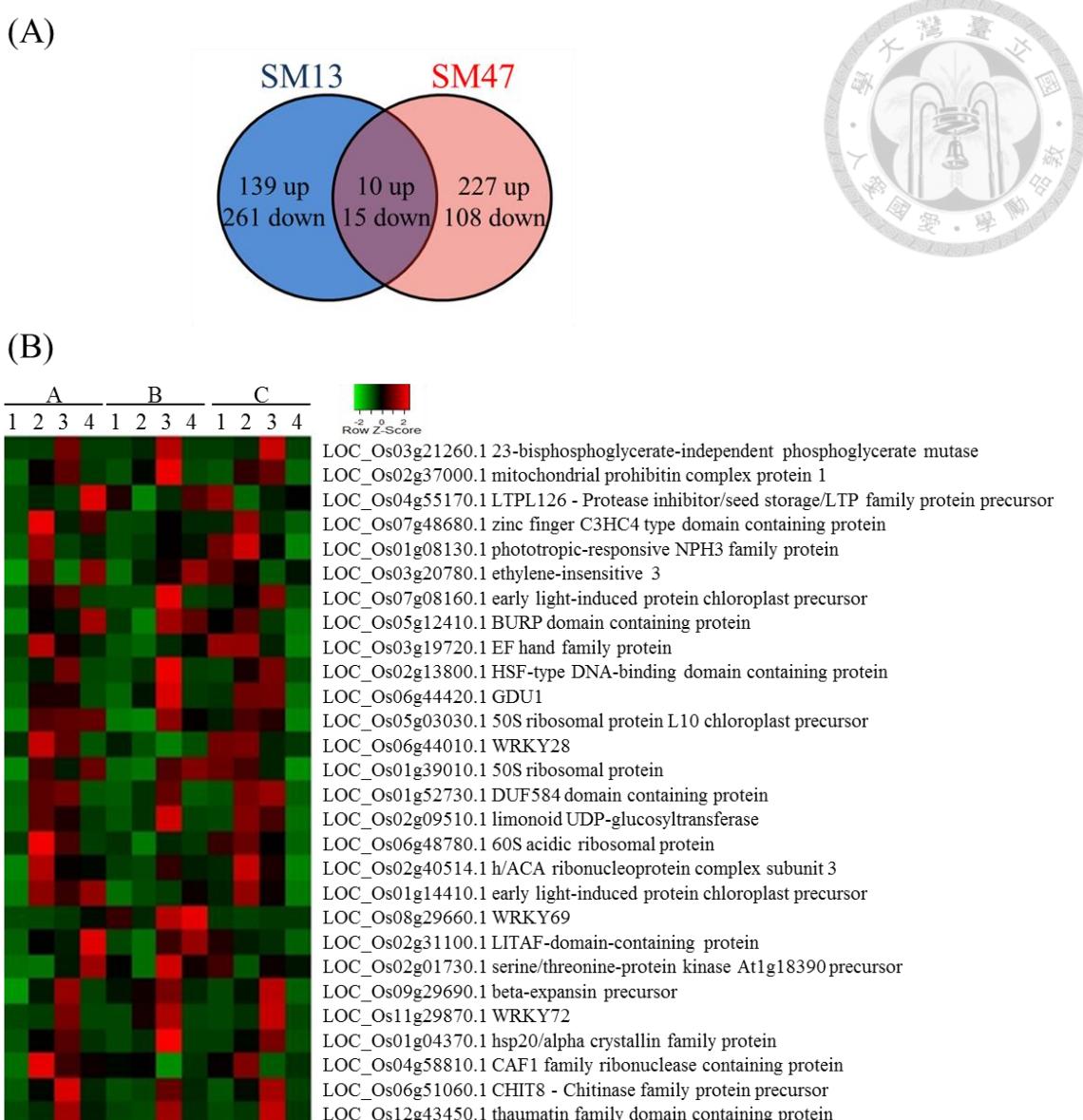


圖 8、IR64 與耐旱突變系在正常情況下的轉錄體差異

Figure 8. Differences between IR64 and its mutants under normal growth (control)

(A) SM13 及 SM47 各自與 IR64 在正常情況下的 DEGs 之 venn diagram，利用 DEGseq 篩選 IR64 與突變系在正常情況下的 DEGs，篩選標準為兩者控制組之比值取 $\log_2 \geq 0.5$ 且 $p\text{-value} \leq 0.05$ 。(B) 突變系與 IR64 在正常情況下的 DEGs 之 heatmap，將正常情況下的 DEGs 取聯集並進行 GO 分析功能，挑出逆境反應 (GO:0006950)、刺激反應 (GO:0050896)、非生物逆境刺激 (GO:0009628)、生物逆境刺激 (GO:0009607) 等功能中的基因觀察在乾旱下的表現趨勢。A、B 以及 C 分別表示 IR64、SM13 以及 SM47。1、2、3 以及 4 則表示在 0 hr、3 hr、24 hr 以及復水 24 hr 的時間點，數值為 RPKM。

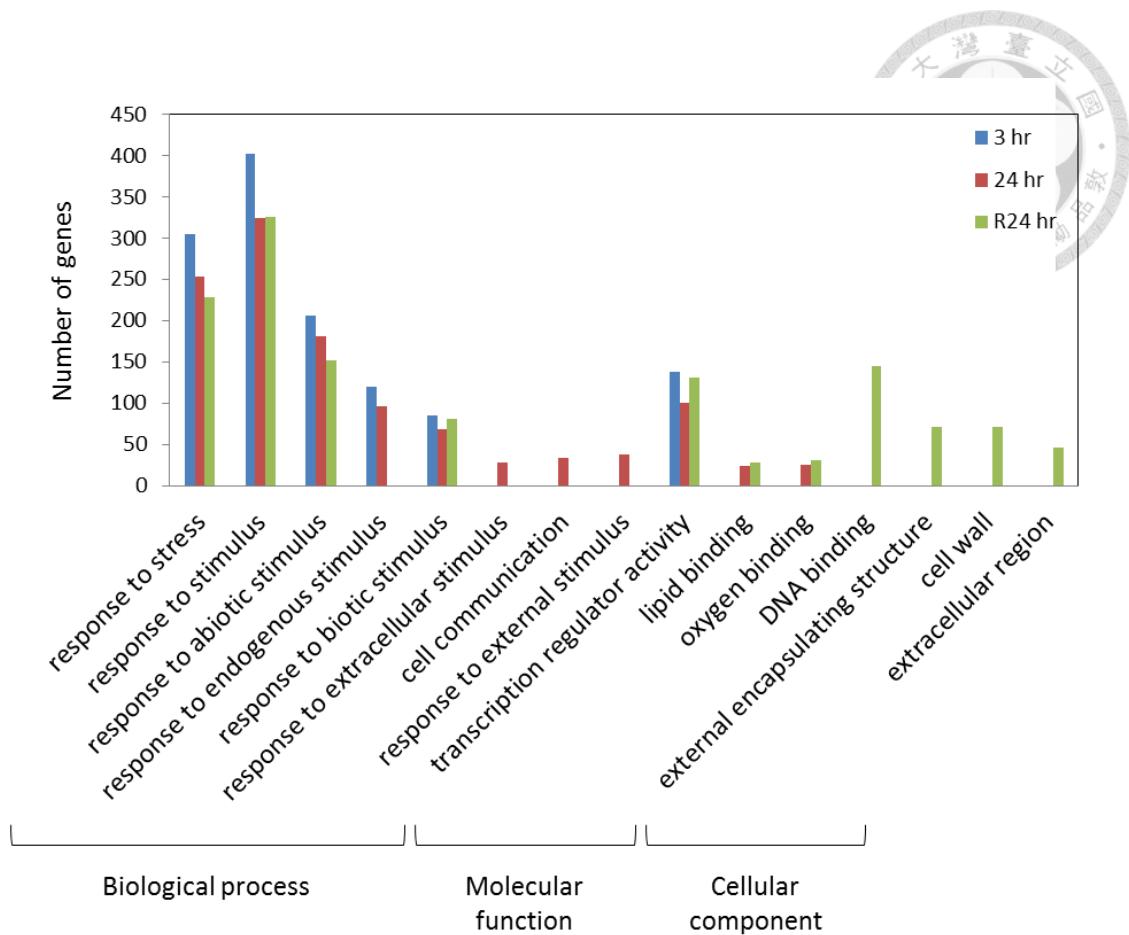


圖 9、至少在任一種籼稻 (SM47、IR64、HY15 以及 TCN1) 中顯著正向調控之差異表現基因 (DEGs) 的數量與功能分析

Figure 9. Gene ontology enrichment of up-regulated DEGs identified at least in one indica rice (SM47, IR64, HY15 and TCN1)

DEGs 的篩選標準為處理組與控制組之比值取 $\log_2 \geq 1$ 且 $p\text{-value} \leq 0.05$ ，顯著 GO 功能的篩選標準為 $\text{FDR} \leq 0.05$ 。

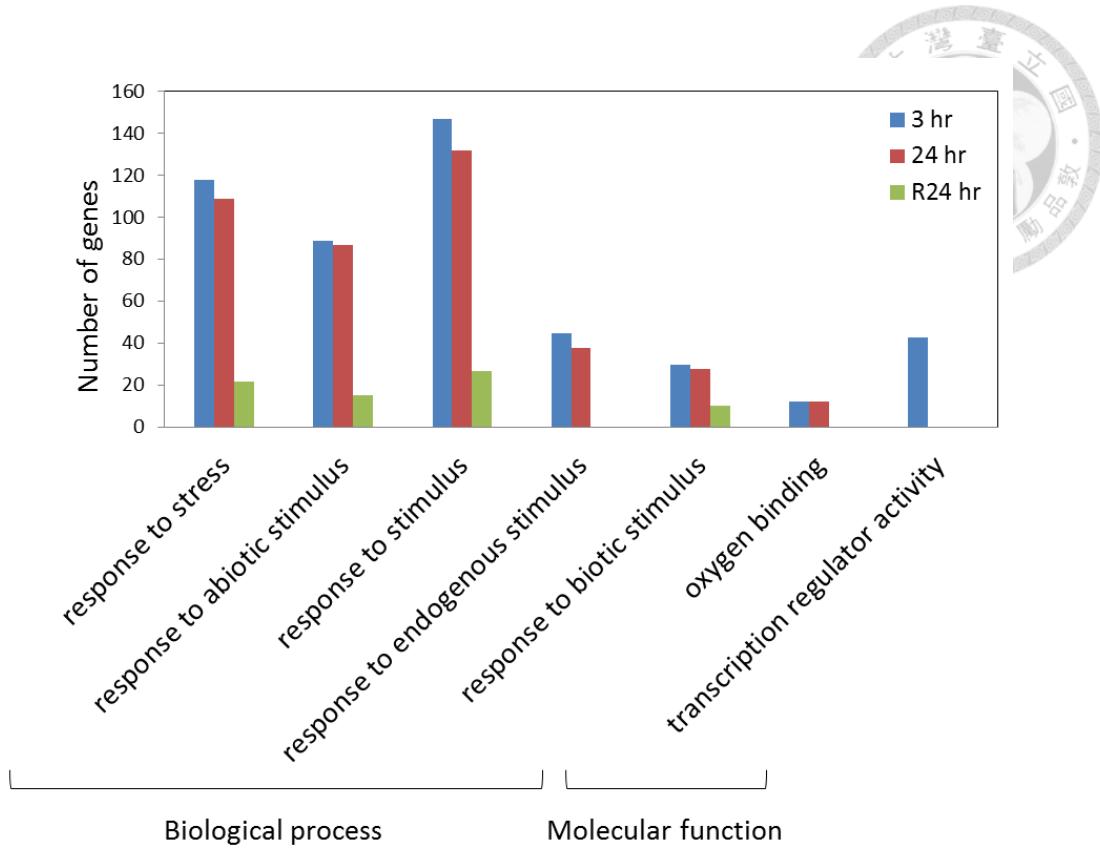


圖 10、四種籼稻 (SM47、IR64、HY15 以及 TCN1) 中共通的正向調控差異表現基因 (DEGs) 的數量與功能分析

Figure 10. Gene ontology enrichment of up-regulated DEGs common in 4 indica rice (SM47, IR64, HY15 and TCN1)

DEGs 的篩選標準為處理組與控制組之比值取 $\log_2 \geq 1$ 且 $p\text{-value} \leq 0.05$ ，顯著 GO 功能的篩選標準為 $\text{FDR} \leq 0.05$ 。

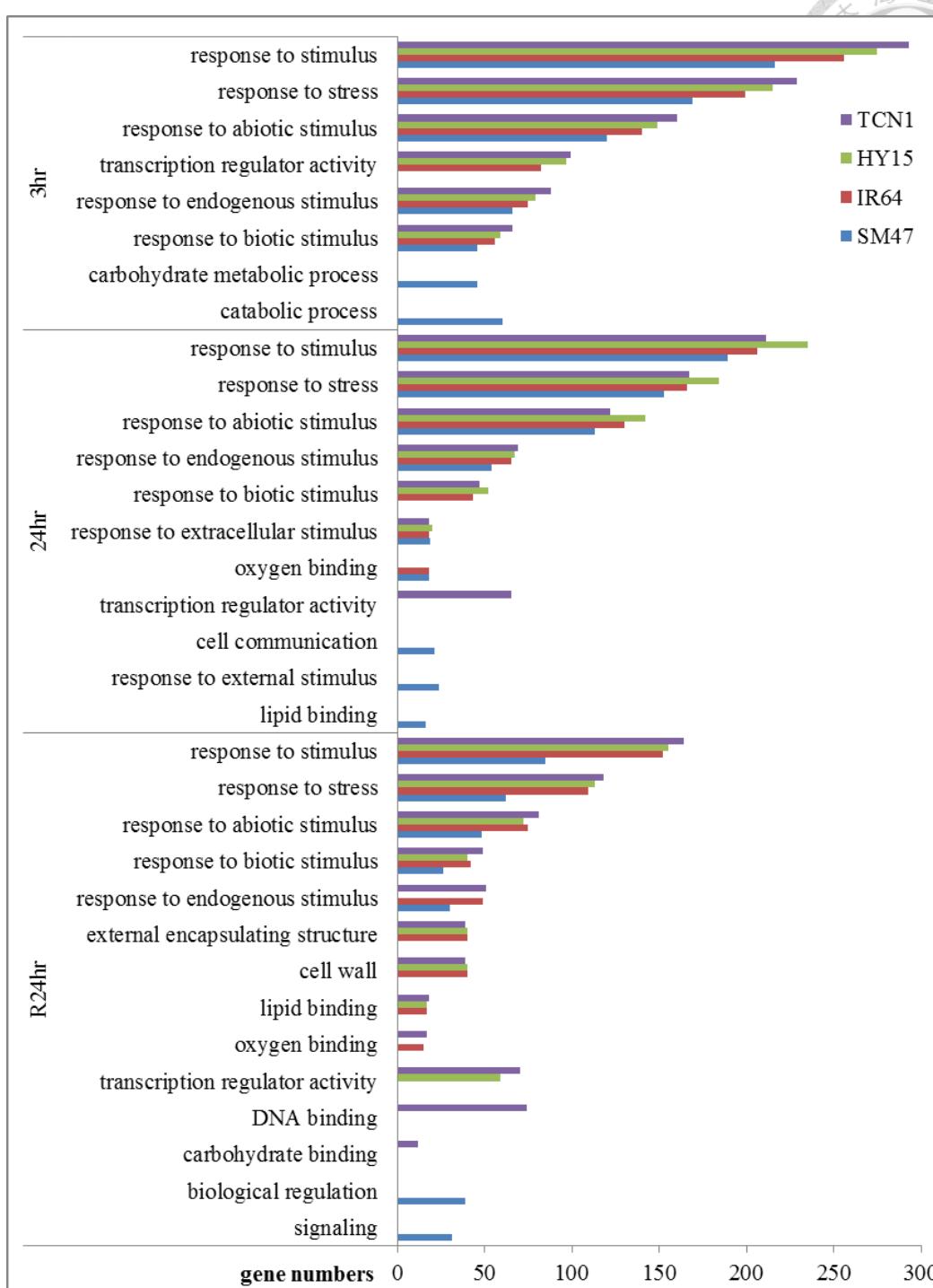


圖 11、四種秈稻 (SM47、IR64、HY15 以及 TCN1) 在不同乾旱處理時期下的顯著正向調控基因功能

Figure 11. Gene ontology enrichment of up-regulated DEGs in 4 indica rice (SM47, IR64, HY15 and TCN1)

DEGs 的篩選標準為處理組與控制組之比值取 $\log_2 \geq 1$ 且 $p\text{-value} \leq 0.05$ ，顯著 GO 功能的篩選標準為 $FDR \leq 0.05$ 。

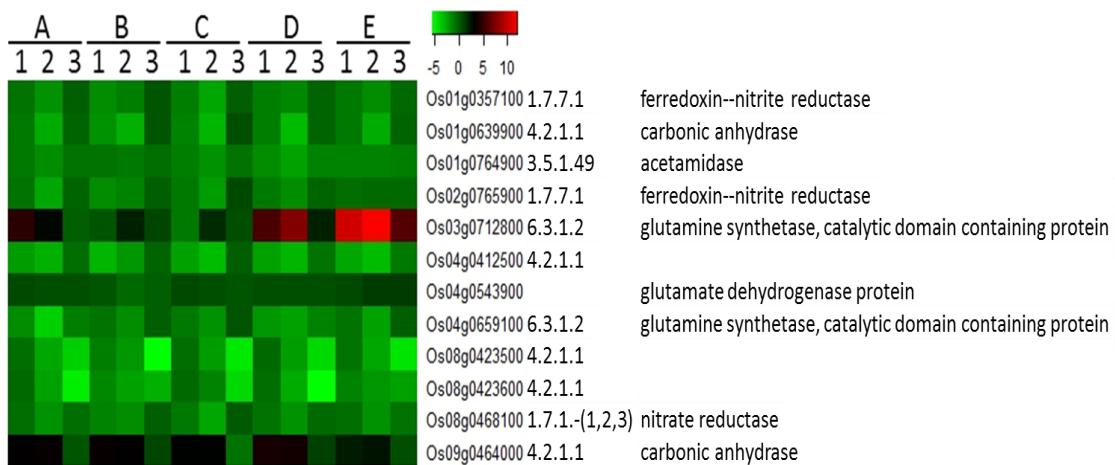
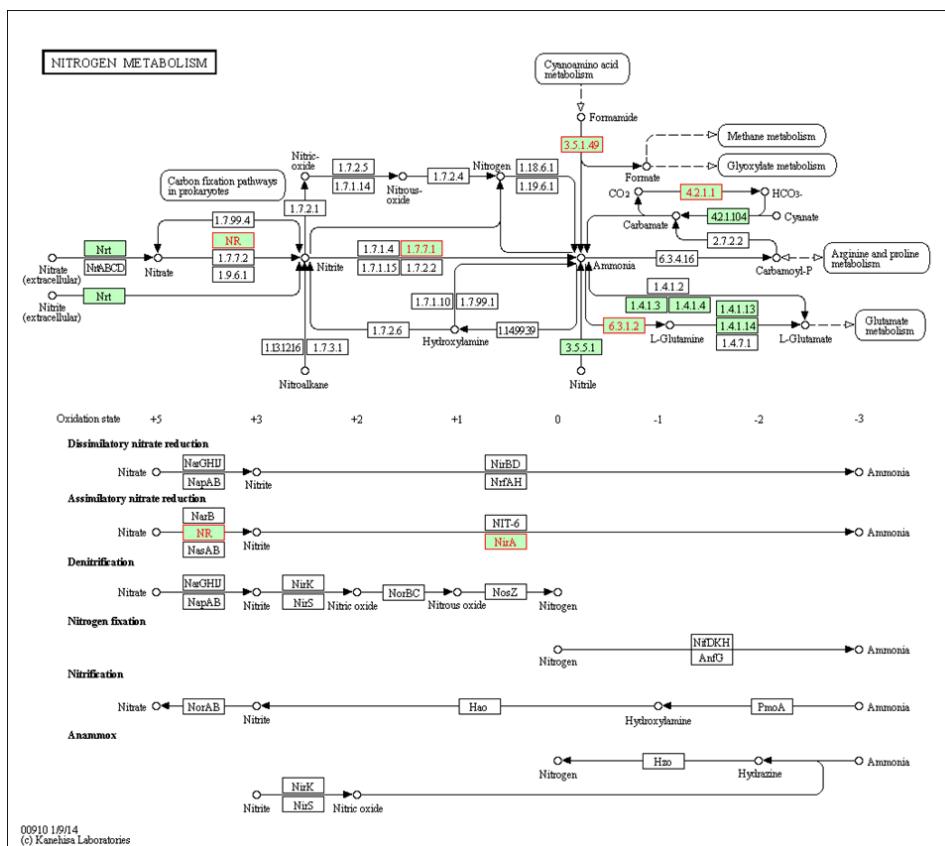


圖 12、參與氮素代謝路徑的 DEGs 表現情形

Figure 12. Gene expression analysis of DEGs associated with nitrogen metabolism

路徑中標註為紅字的基因為五種秈稻的 DEGs。A、B、C、D 以及 E 分別表示 IR64、SM13、SM47、HY15 以及 TCN1。1、2 以及 3 則表示在 3 hr、24 hr 以及復水 24 hr 的時間點，數值皆為處理組與控制組的 \log_2 foldchange。註：Os04g0412500、Os08g0423500 以及 Os08g0423600 為 bifunctional monodehydroascorbate reductase and carbonic anhydrasenectarin-3 precursor。

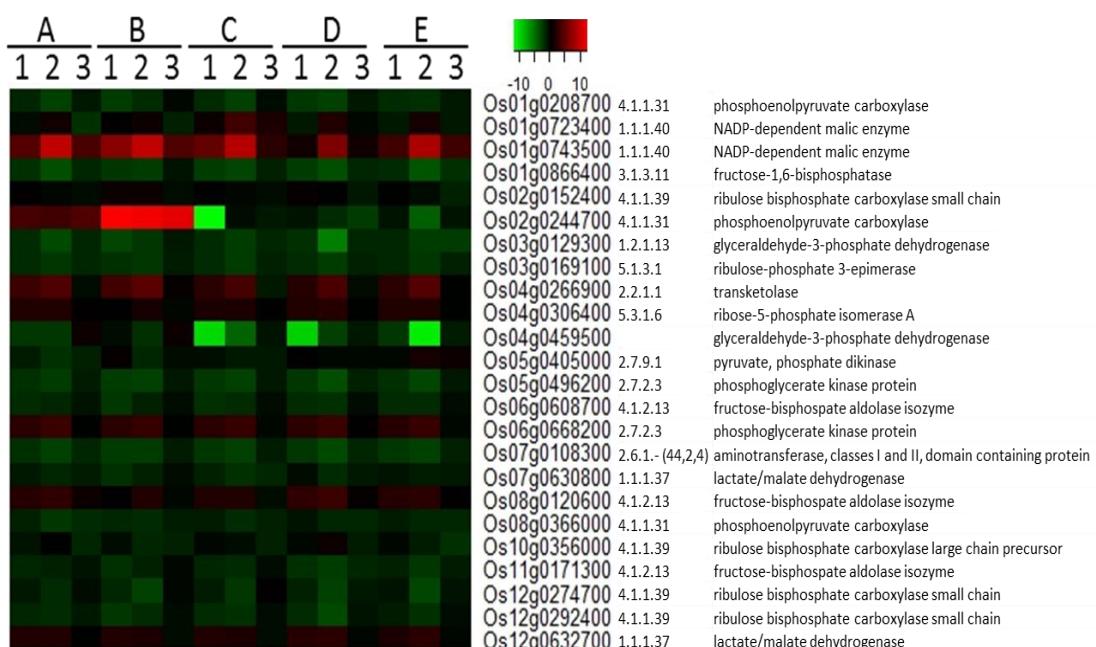
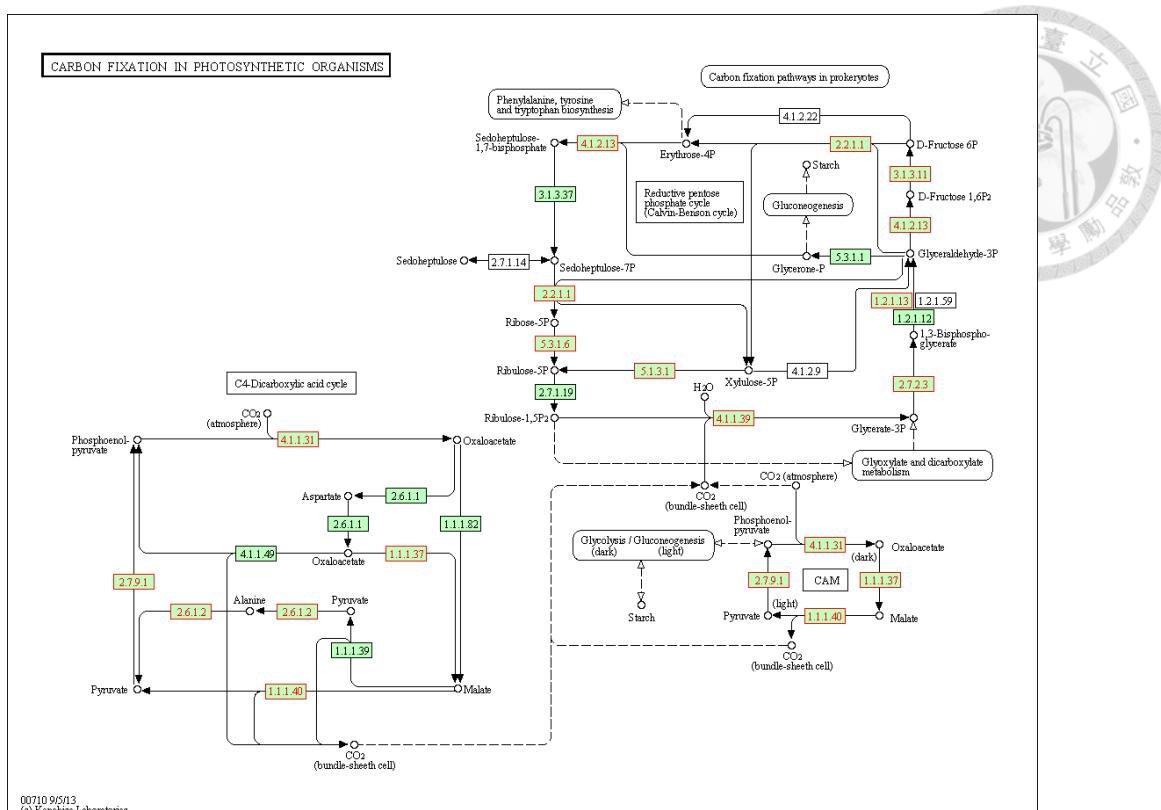
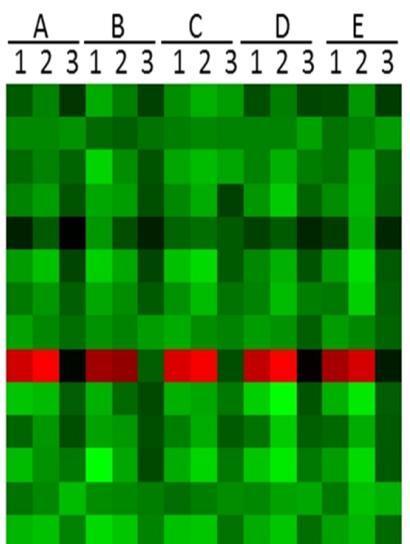
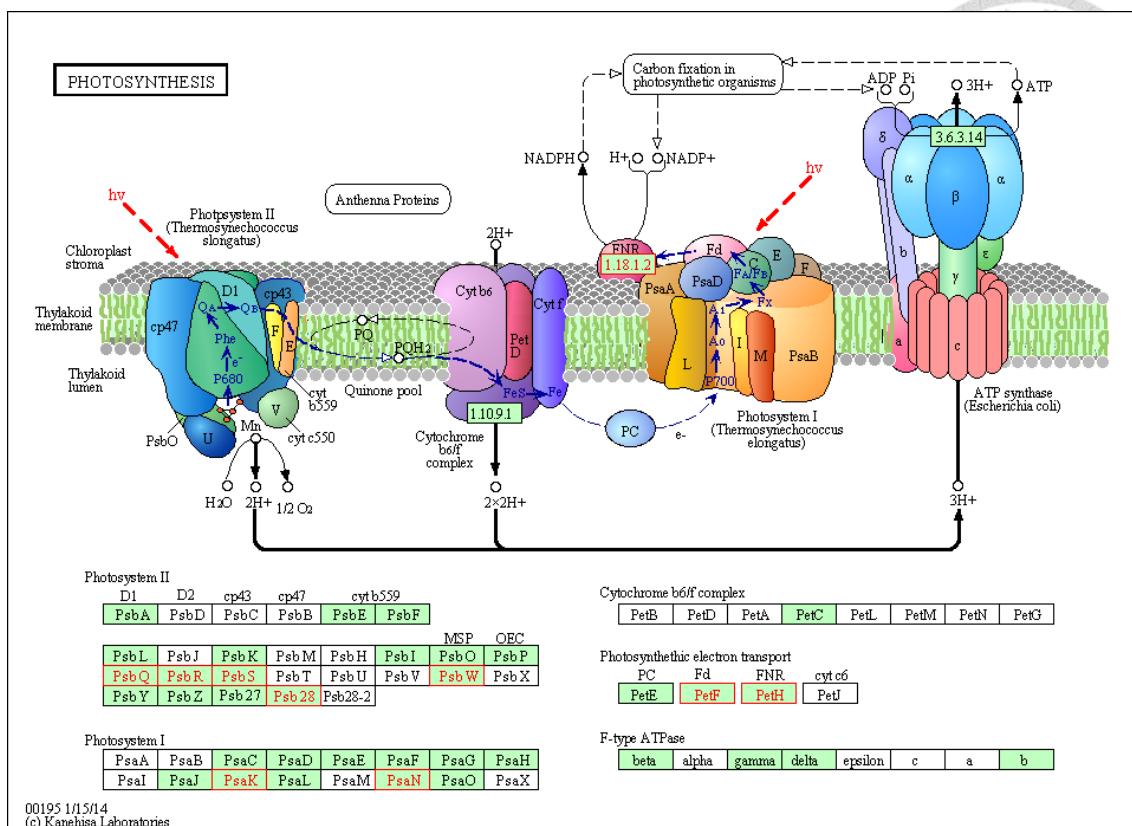


圖 13、參與光合系統裡固碳作用的 DEGs 表現情形

Figure 13. Gene expression analysis of DEGs associated with carbon fixation in photosynthetic organisms

路徑中標註為紅字的基因为五種稻的 DEGs。A、B、C、D 以及 E 分別表示 IR64、SM13、SM47、HY15 以及 TCN1。1、2 以及 3 則表示在 3 hr、24 hr 以及復水 24 hr 的時間點，數值皆為處理組與控制組的 \log_2 foldchange。



Os01g0773700PsbW
 photosystem II reaction center W protein
 Os01g0860601PetF
 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain containing protein
 Os01g0869800PsbS
 chlorophyll A-B binding protein
 Os01g0938100Psb28
 photosystem II reaction center PSB28 protein
 Os03g0659200PetF
 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain containing protein
 Os04g0412200PetF
 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain containing protein
 Os06g01077001.18.1.2/PetH ferredoxin--NADP reductase
 Os07g0147500
 photosystem II 10 kDa polypeptide
 Os07g0147550PsbR
 photosystem II 10 kDa polypeptide
 Os07g0148900PsaK
 photosystem I reaction center subunit
 Os07g0544800
 oxygen evolving enhancer protein 3 domain containing protein
 Os08g0104600
 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain containing protein
 Os08g0200300PsbR
 photosystem II 10 kDa polypeptide
 Os12g0189400PsaN
 photosystem I reaction center subunit N

圖 14、參與光合作用路徑的 DEGs 表現情形

Figure 14. Gene expression analysis of DEGs associated with photosynthesis

路徑中標註為紅字的基因為五種水稻的 DEGs。A、B、C、D 以及 E 分別表示 IR64、SM13、SM47、HY15 以及 TCN1。1、2 以及 3 則表示在 3 hr、24 hr 以及復水 24 hr 的時間點，數值皆為處理組與控制組的 \log_2 foldchange。

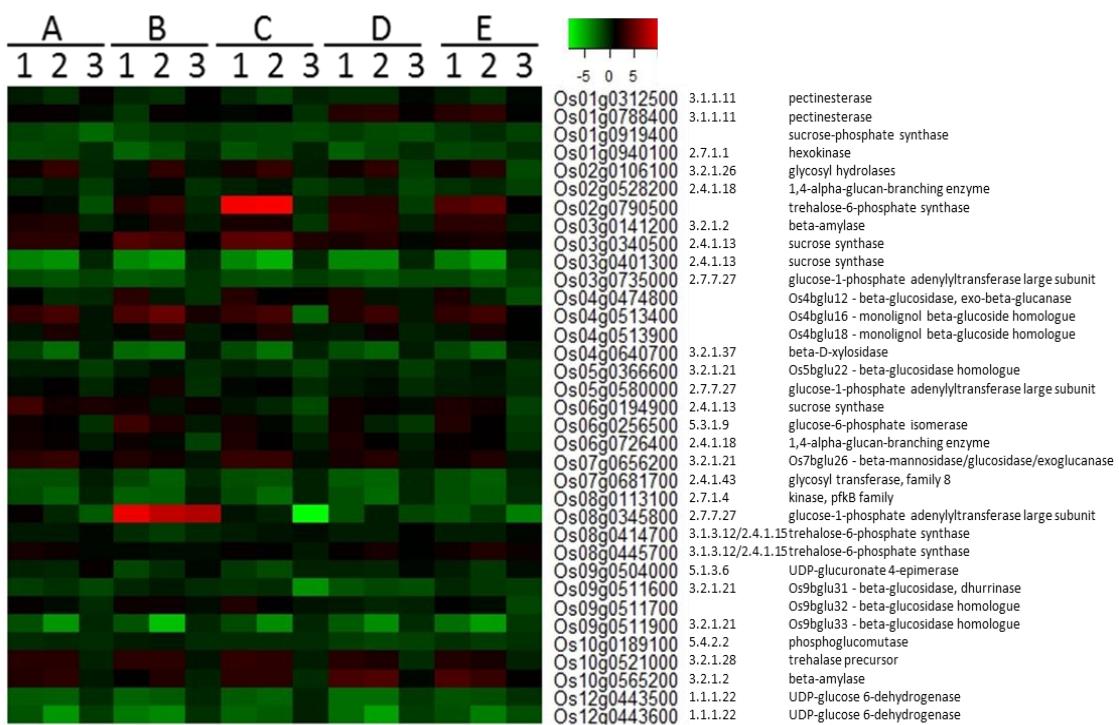
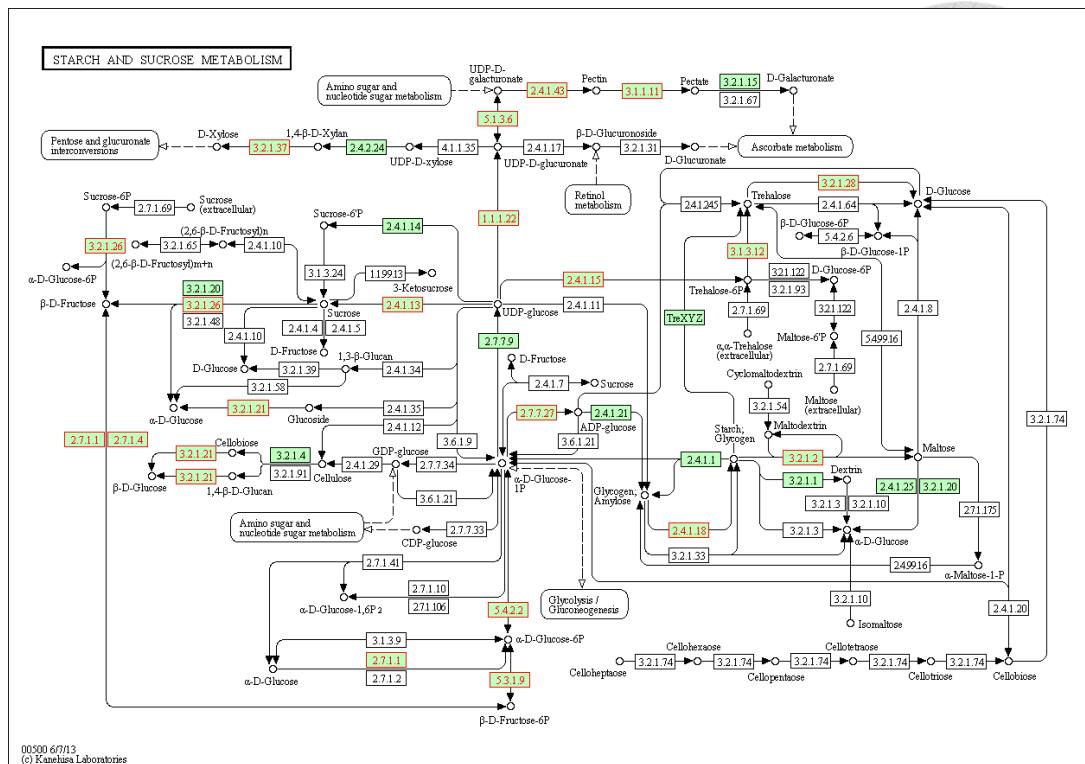


圖 15、參與澱粉與蔗糖代謝路徑的 DEGs 表現情形

Figure 15. Gene expression analysis of DEGs associated with starch and sucrose metabolism

路徑中標註為紅字的基因為五種秈稻的 DEGs。A、B、C、D 以及 E 分別表示 IR64、SM13、SM47、HY15 以及 TCN1。1、2 以及 3 則表示在 3 hr、24 hr 以及復水 24 hr 的時間點，數值皆為處理組與控制組的 \log_2 foldchange。

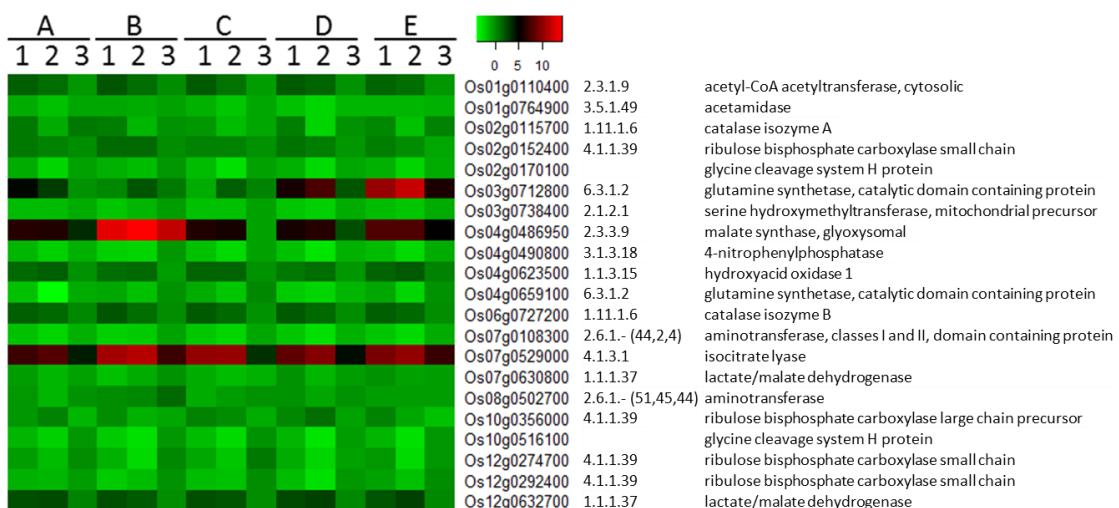
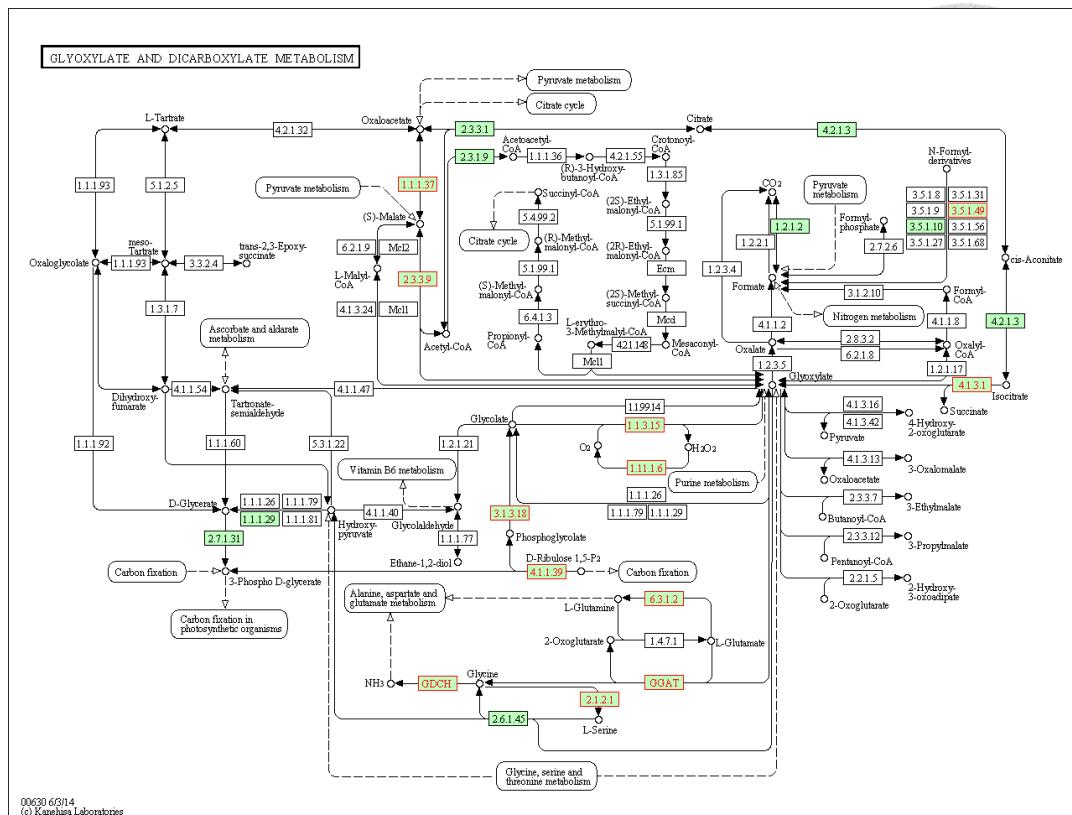


圖 16、參與乙醛酸及二羧酸代謝路經的 DEGs 表現情形

Figure 16. Gene expression analysis of DEGs associated with glyoxylate and dicarboxylate metabolism

路徑中標註為紅字的基因為五種秈稻的 DEGs。A、B、C、D 以及 E 分別表示 IR64、SM13、SM47、HY15 以及 TCN1。1、2 以及 3 則表示在 3 hr、24 hr 以及復水 24 hr 的時間點，數值皆為處理組與控制組的 \log_2 foldchange。

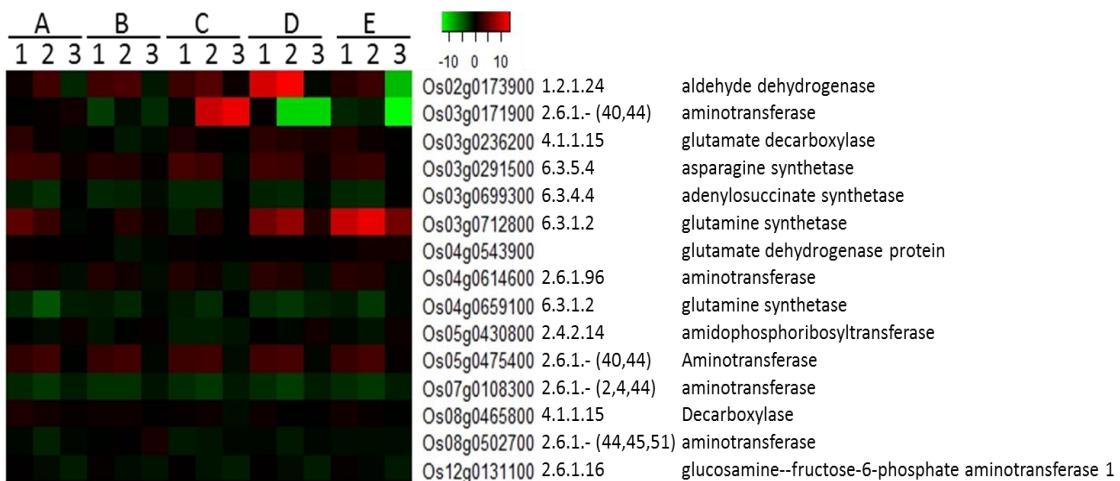
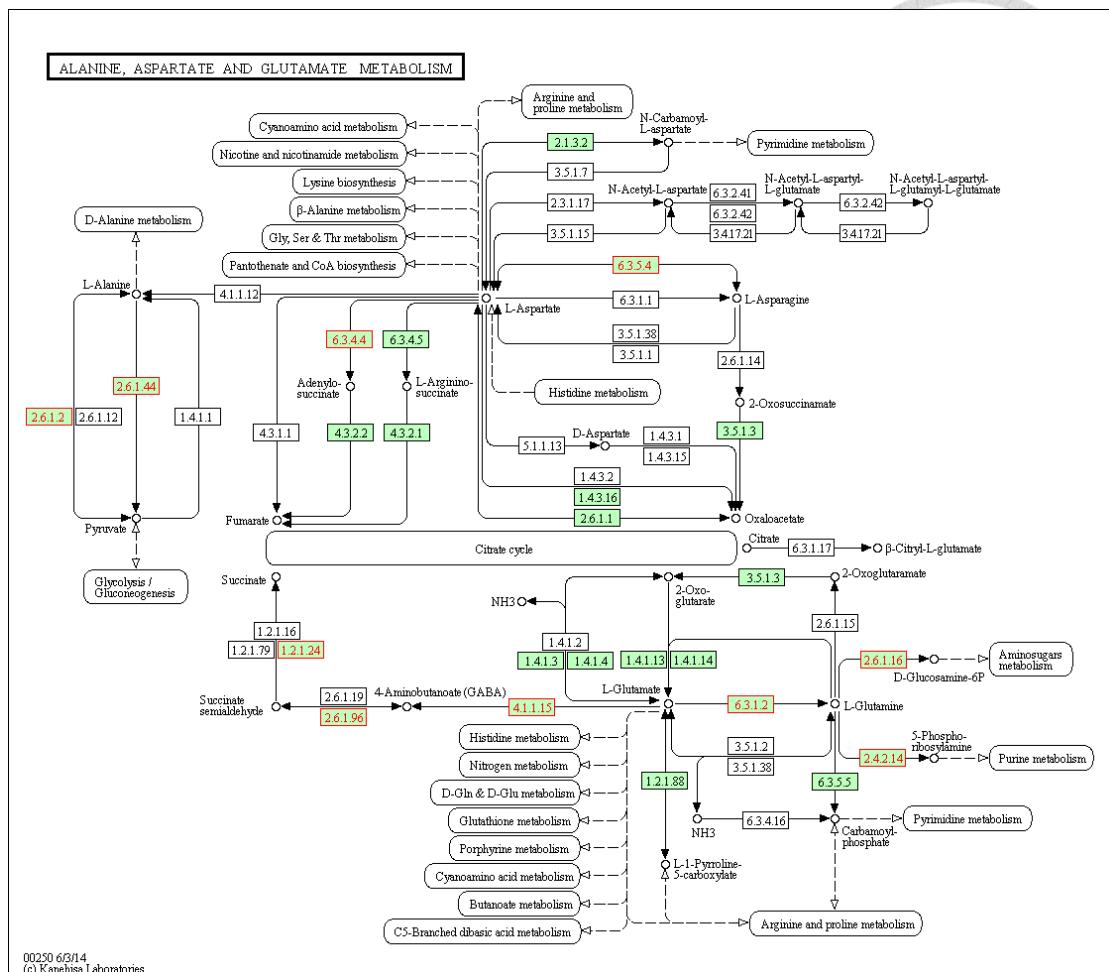


圖 17、參與丙氨酸、天門冬氨酸以及麩氨酸代謝路徑的 DEGs 表現情形

Figure 17. Gene expression analysis of DEGs associated with alanine, aspartate and glutamate metabolism

路徑中標註為紅字的基因為五種水稻的 DEGs。A、B、C、D 以及 E 分別表示 IR64、SM13、SM47、HY15 以及 TCN1。1、2 以及 3 則表示在 3 hr、24 hr 以及復水 24 hr 的時間點，數值皆為處理組與控制組的 \log_2 foldchange。

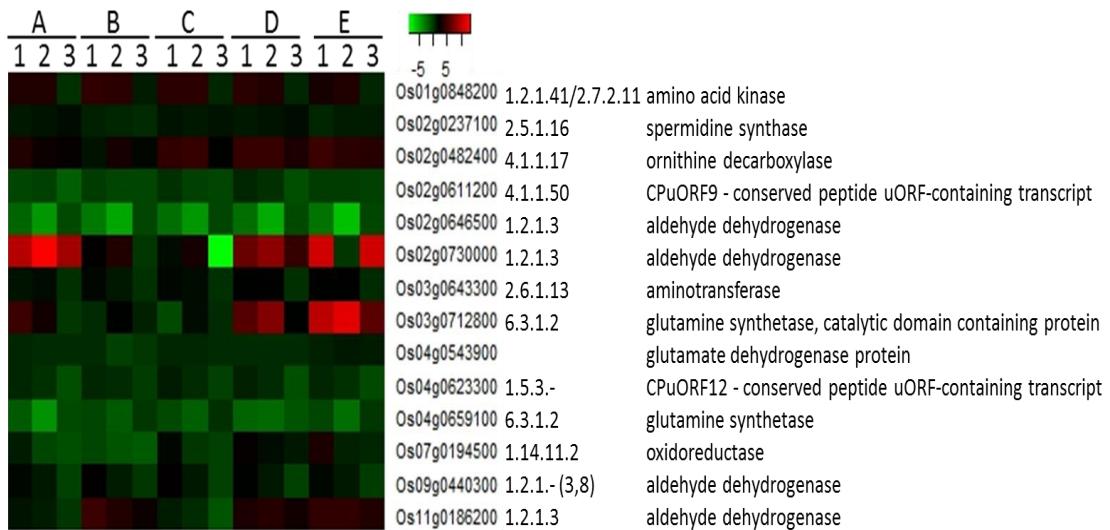
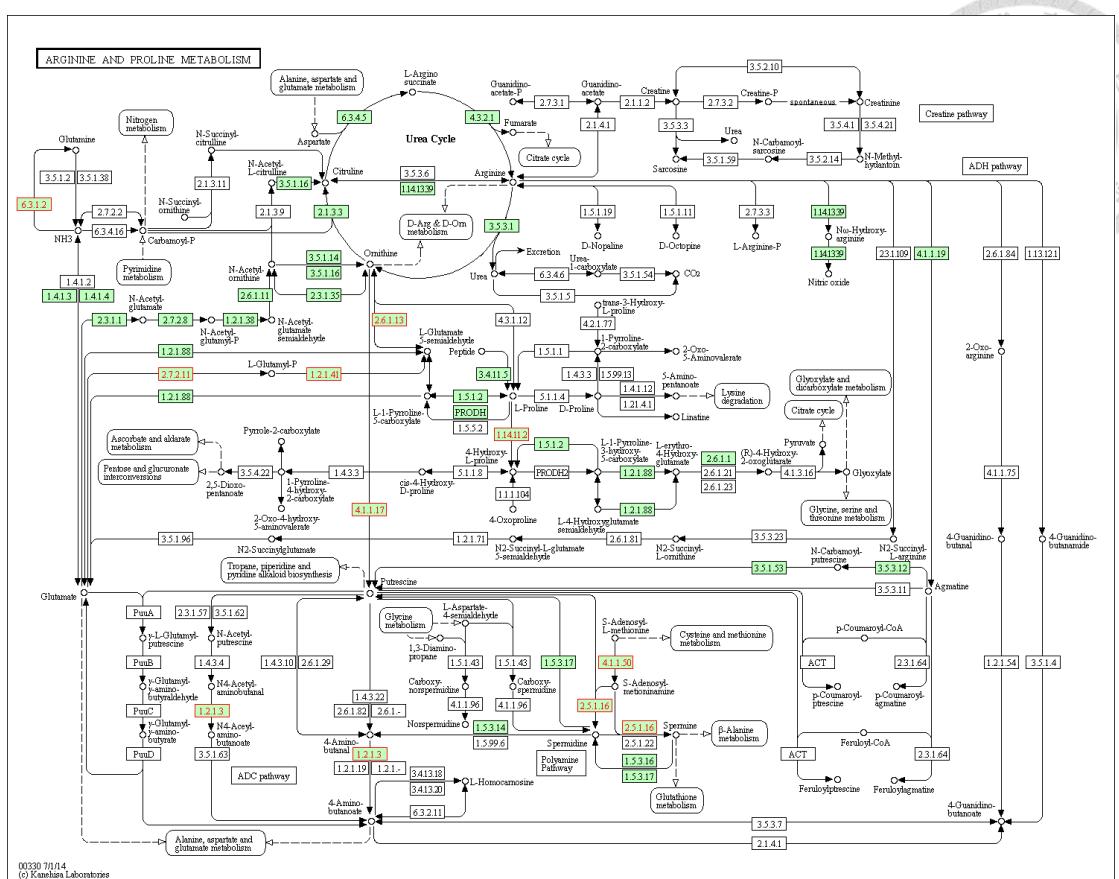


圖 18、參與精胺酸及脯胺酸代謝路徑的 DEGs 表現情形

Figure 18. Gene expression analysis of DEGs associated with arginine and proline metabolism

路徑中標註為紅字的基因為五種秈稻的 DEGs。A、B、C、D 以及 E 分別表示 IR64、SM13、SM47、HY15 以及 TCN1。1、2 以及 3 則表示在 3 hr、24 hr 以及復水 24 hr 的時間點，數值皆為處理組與控制組的 \log_2 foldchange。

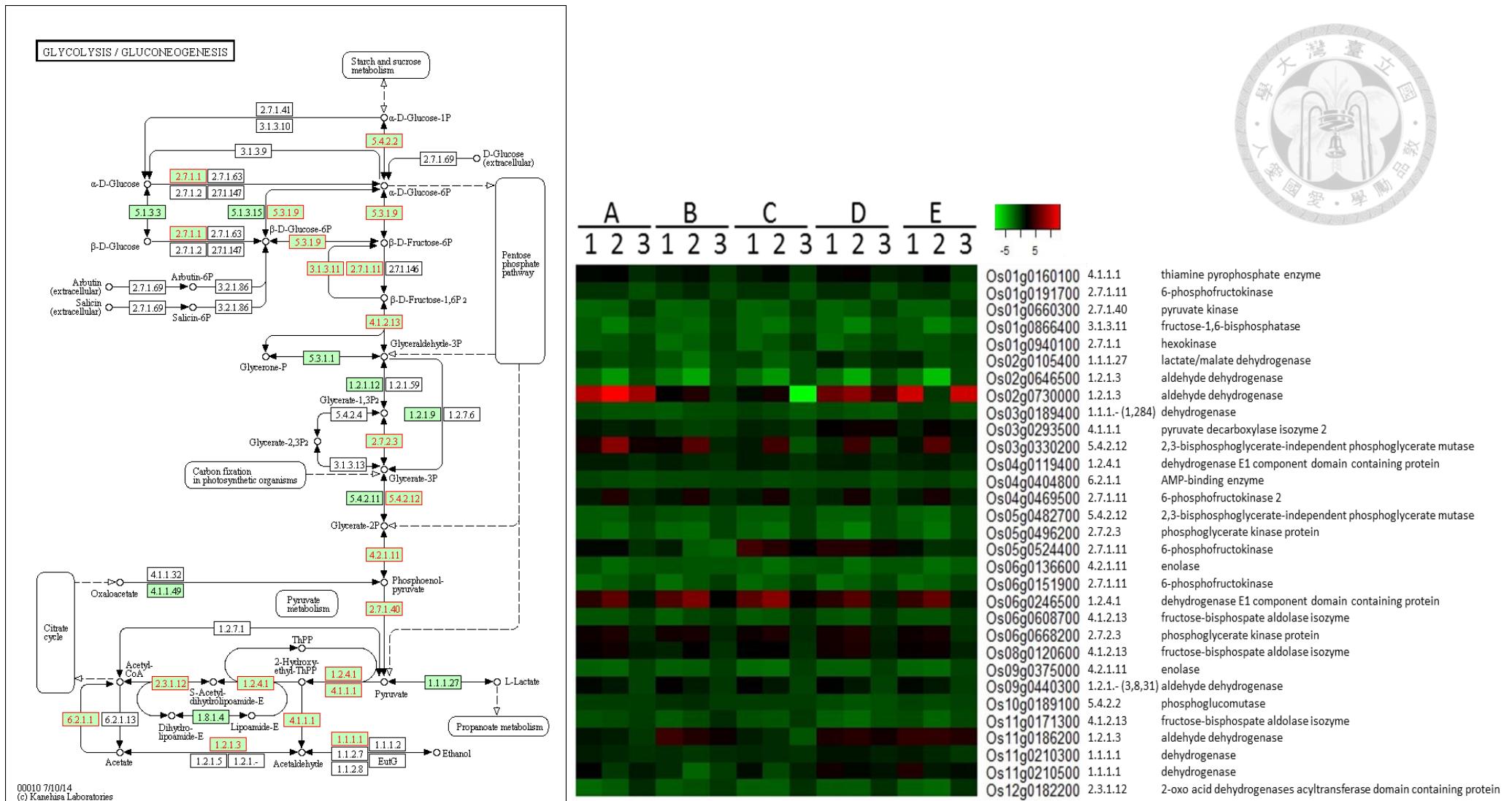


圖 19、參與糖解與糖質新生作用的 DEGs 表現情形

Figure 19. Gene expression analysis of DEGs associated with glycolysis and gluconeogenesis

路徑中標註為紅字的基因為五種稻的 DEGs。A、B、C、D 以及 E 分別表示 IR64、SM13、SM47、HY15 以及 TCN1。1、2 以及 3 則表示在 3 hr、24 hr 以及復水 24 hr 的時間點，數值皆為處理組與控制組的 \log_2 foldchange。

PLANT HORMONE SIGNAL TRANSDUCTION

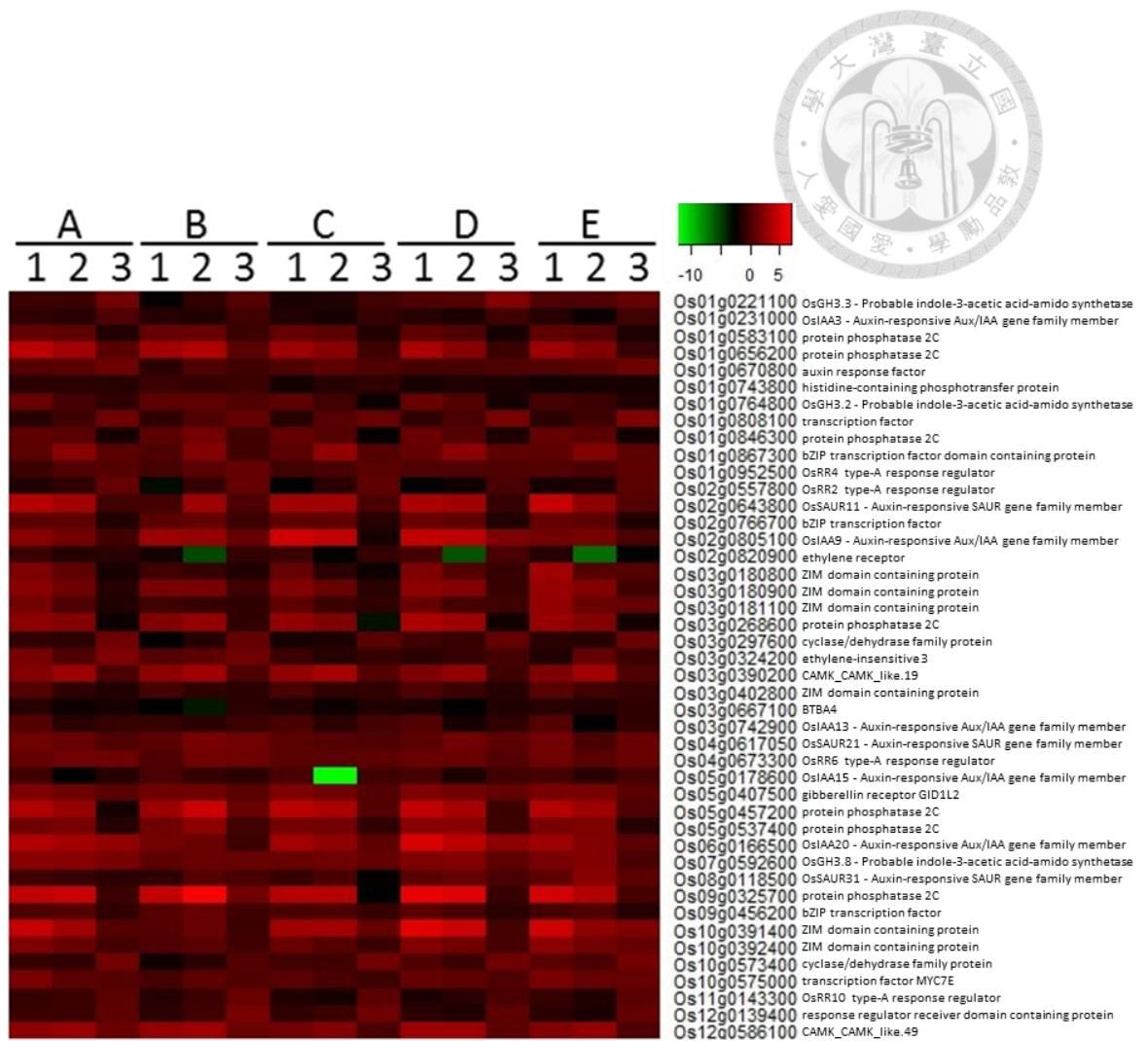
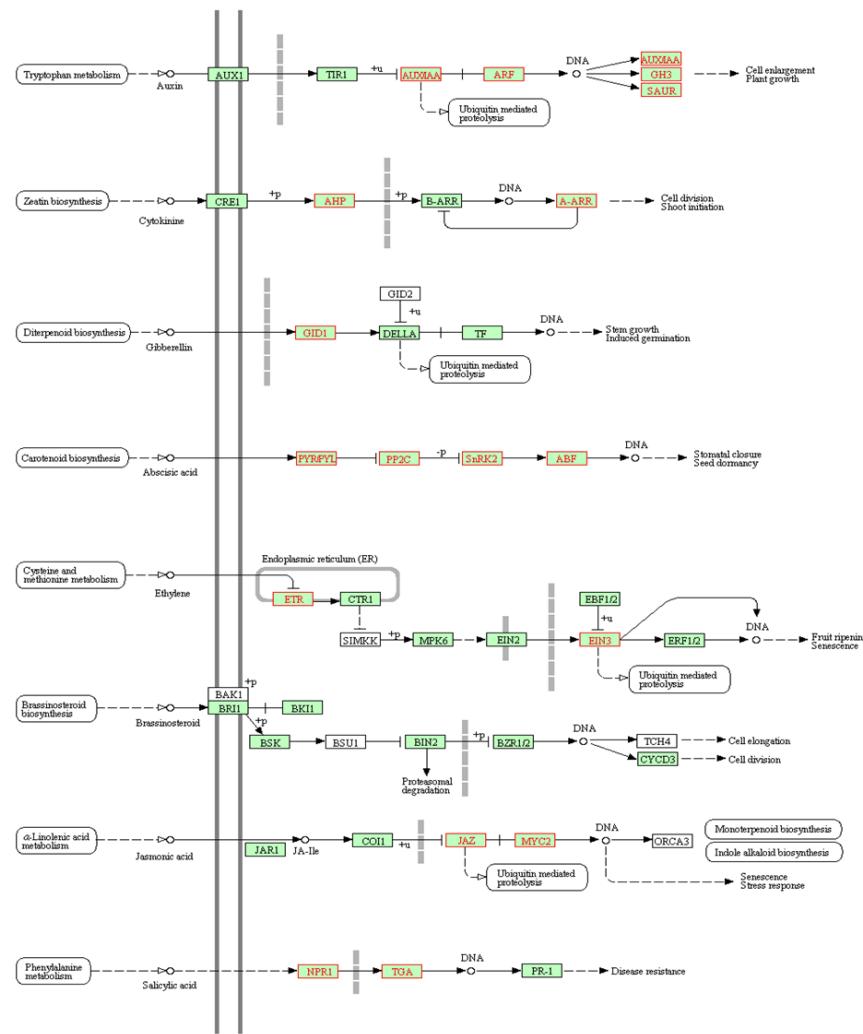


圖 20、參與植物賀爾蒙訊息傳遞路徑的 DEGs 表現情形

Figure 20. Gene expression analysis of DEGs associated with plant hormone signal transduction

路徑中標註為紅字的基因為五種稻的 DEGs。A、B、C、D 以及 E 分別表示 IR64、SM13、SM47、HY15 以及 TCN1。1、2 以及 3 則表示在 3 hr、24 hr 以及復水 24 hr 的時間點，數值皆為處理組與控制組的 log₂ foldchange。

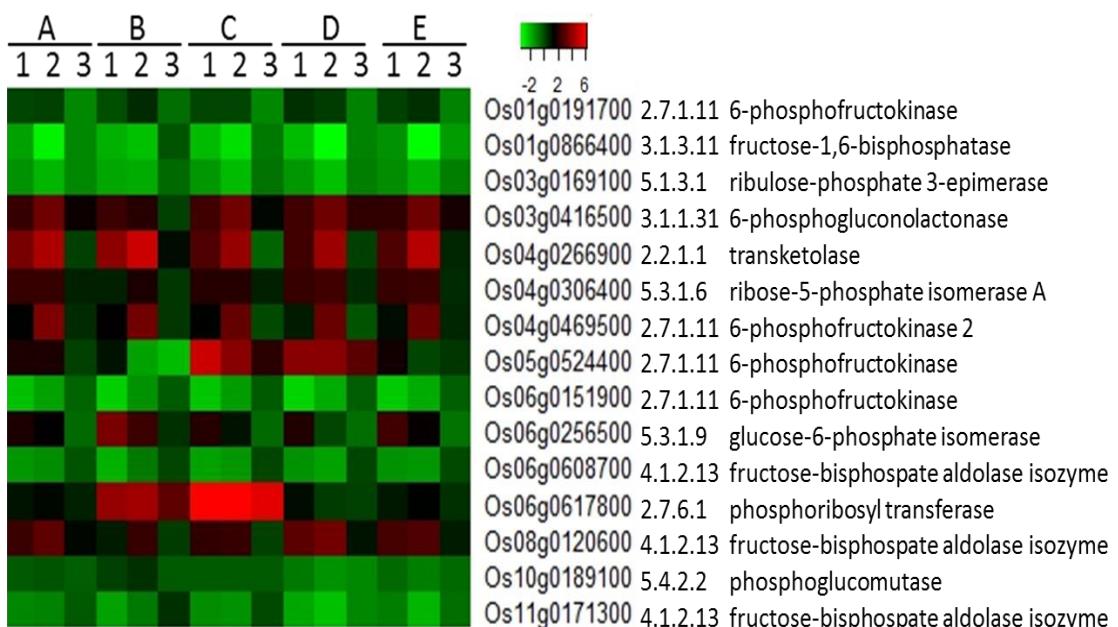
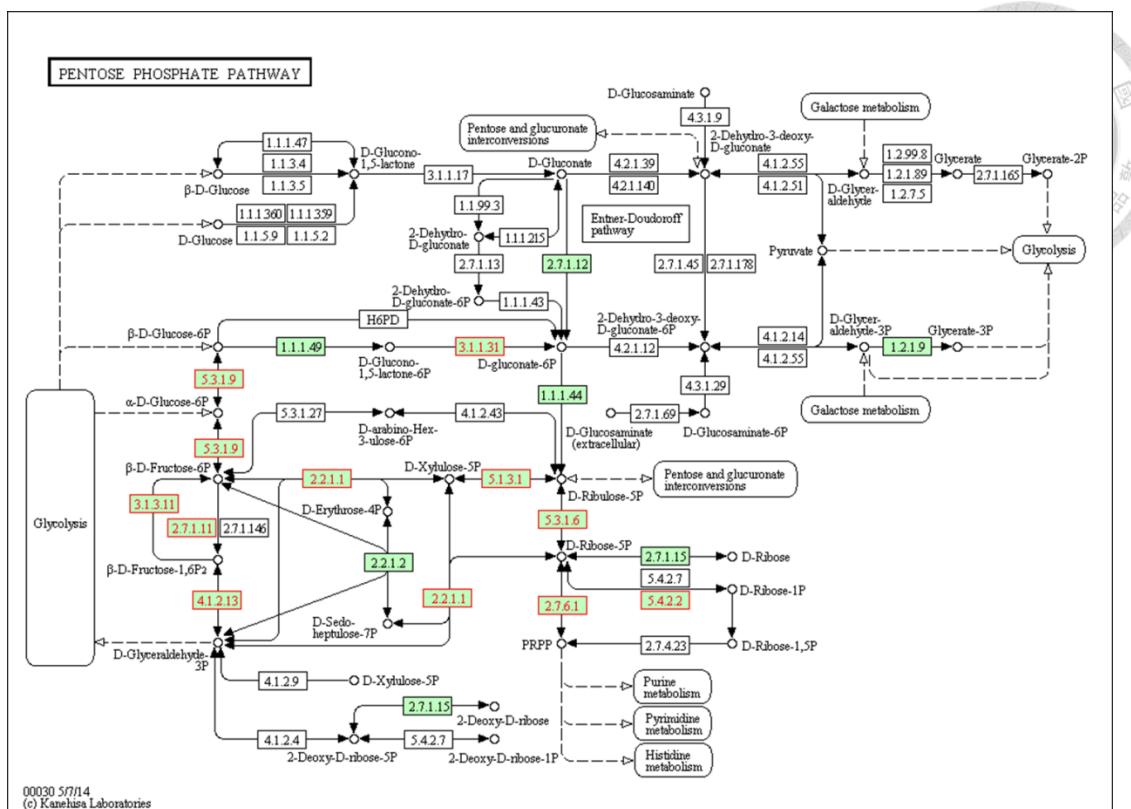


圖 21、參與五碳糖磷酸途徑的 DEGs 表現情形

Figure 21. Gene expression analysis of DEGs associated with pentose phosphate pathway

路徑中標註為紅字的基因為五種秈稻的 DEGs。A、B、C、D 以及 E 分別表示 IR64、SM13、SM47、HY15 以及 TCN1。1、2 以及 3 則表示在 3 hr、24 hr 以及復水 24 hr 的時間點，數值皆為處理組與控制組的 \log_2 foldchange。

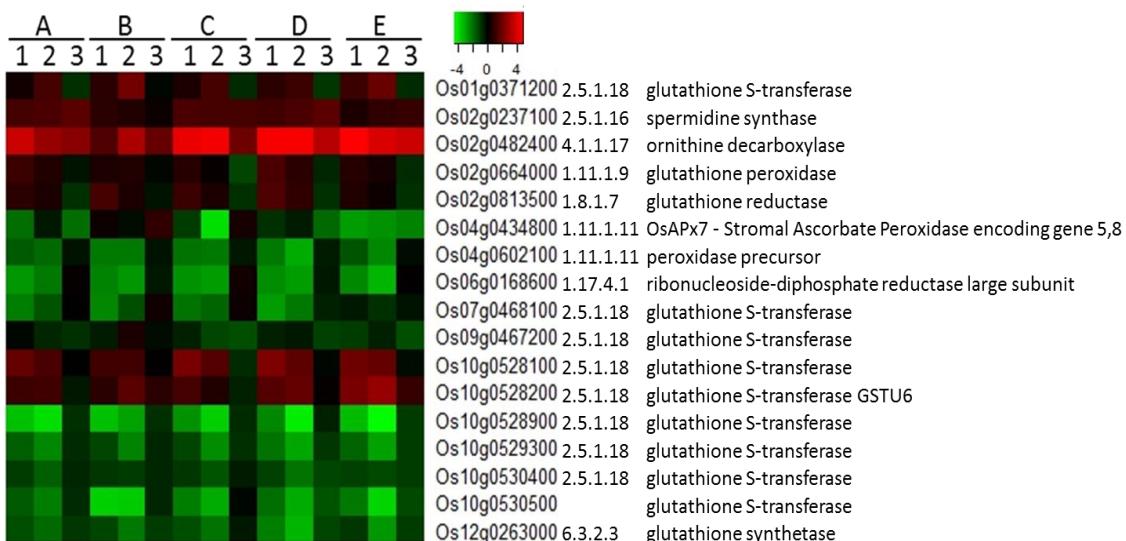
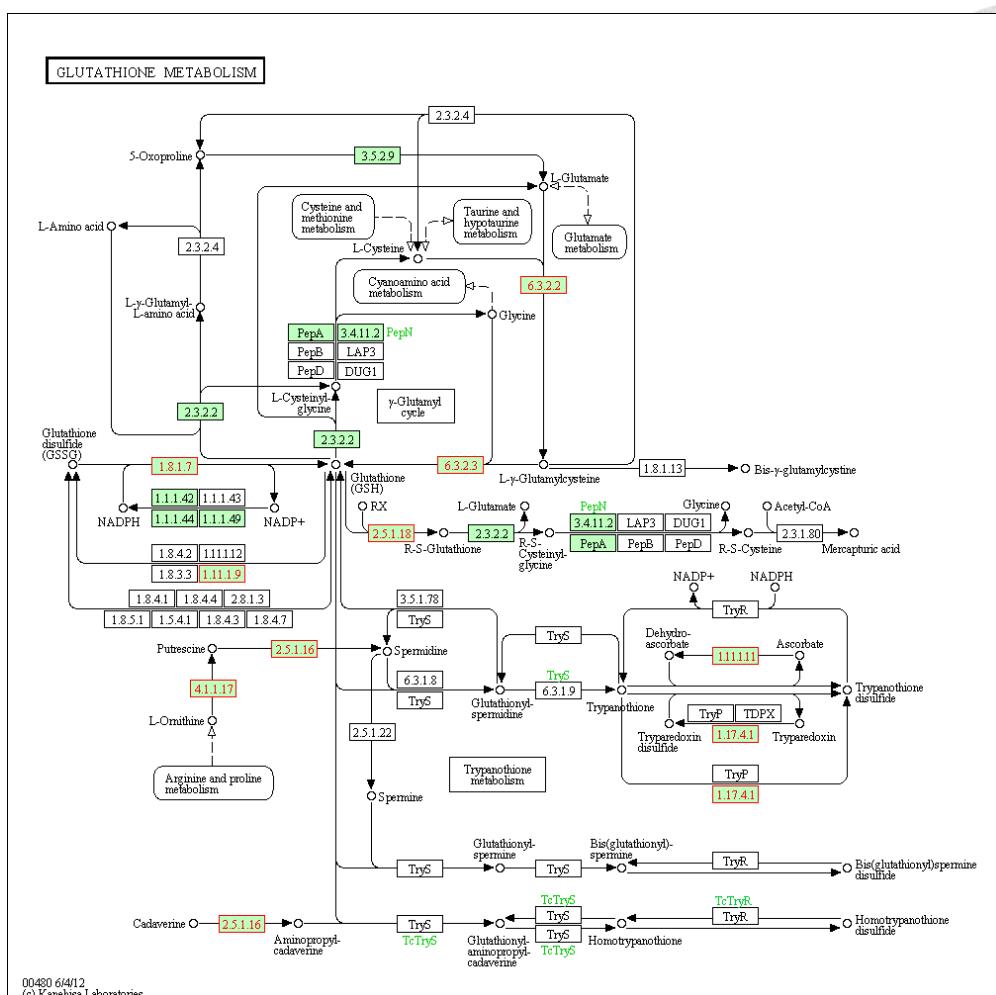


圖 22、參與穀胱甘肽代謝路徑的 DEGs 表現情形

Figure 22. Gene expression analysis of DEGs associated with glutathione metabolism

路徑中標註為紅字的基因為五種稻的 DEGs。A、B、C、D 以及 E 分別表示 IR64、SM13、SM47、HY15 以及 TCN1。1、2 以及 3 則表示在 3 hr、24 hr 以及復水 24 hr 的時間點，數值皆為處理組與控制組的 log2 foldchange。

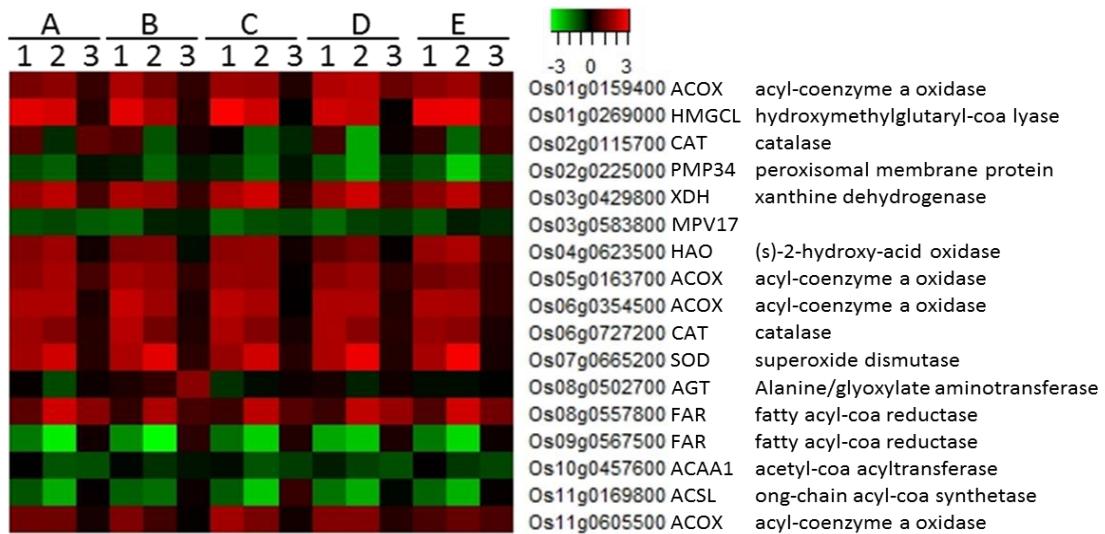
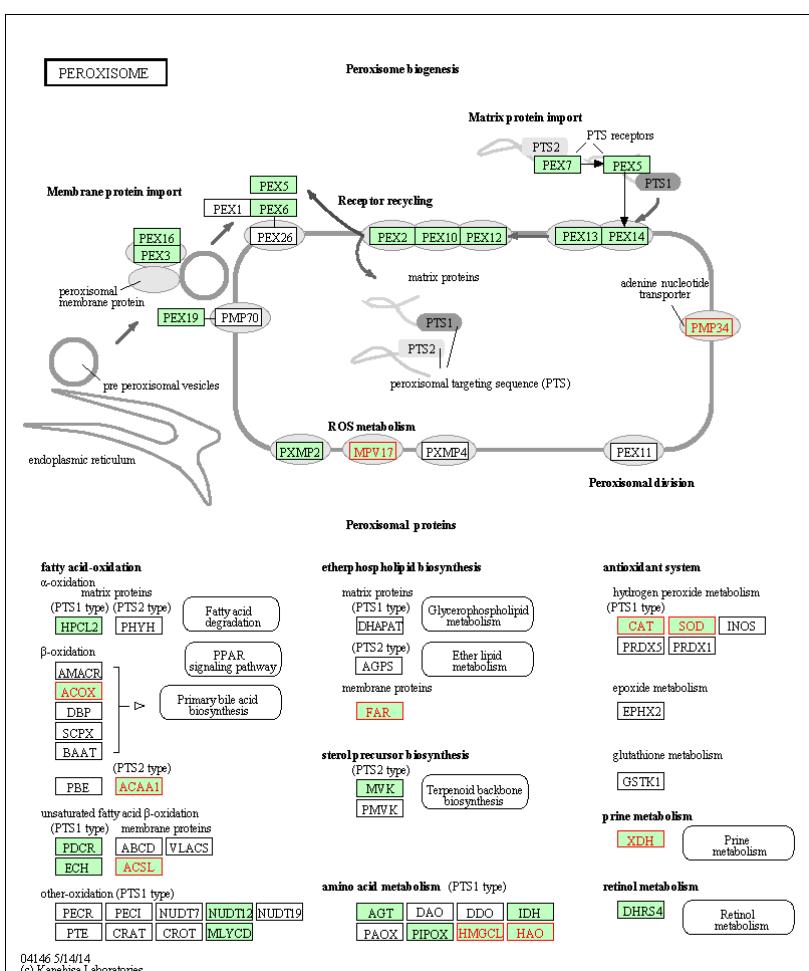


圖 23、參與過氧化體代謝路徑的 DEGs 表現情形

Figure 23. Gene expression analysis of DEGs associated with peroxisome

路徑中標註為紅字的基因為五種稻的 DEGs。A、B、C、D 以及 E 分別表示 IR64、SM13、SM47、HY15 以及 TCN1。1、2 以及 3 則表示在 3 hr、24 hr 以及復水 24 hr 的時間點，數值皆為處理組與控制組的 log2 foldchange。

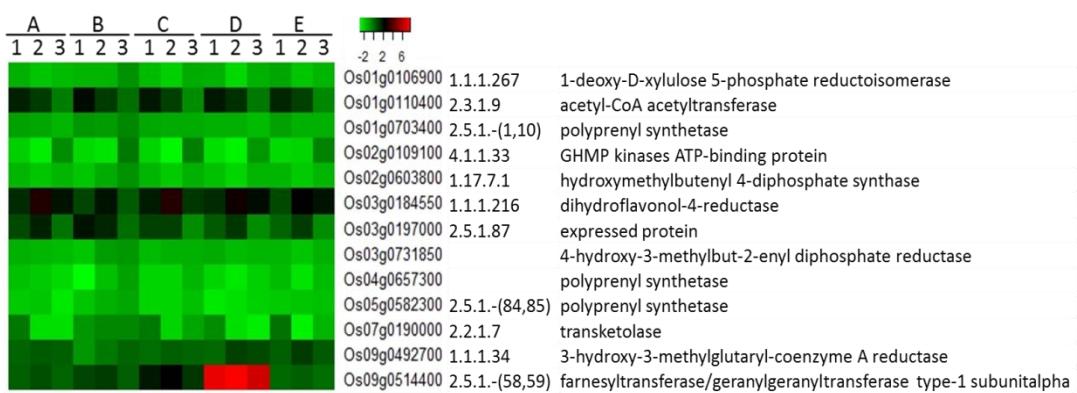
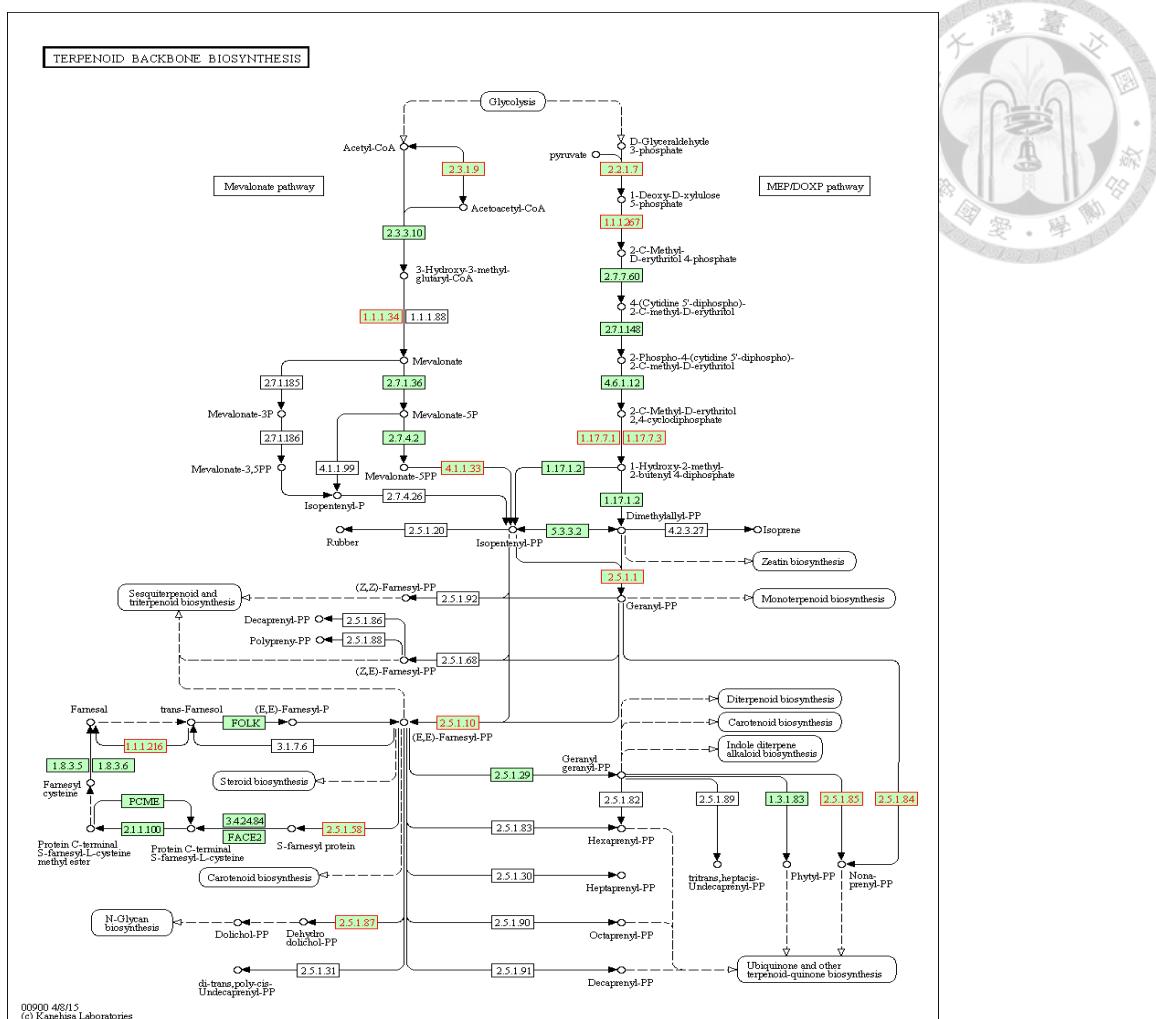


圖 24、參與類萜骨架生合成路徑的 DEGs 表現情形

Figure 24. Gene expression analysis of DEGs associated with terpenoid backbone biosynthesis

路徑中標註為紅字的基因為五種秈稻的 DEGs。A、B、C、D 以及 E 分別表示 IR64、SM13、SM47、HY15 以及 TCN1。1、2 以及 3 則表示在 3 hr、24 hr 以及復水 24 hr 的時間點，數值皆為處理組與控制組的 log₂ foldchange。

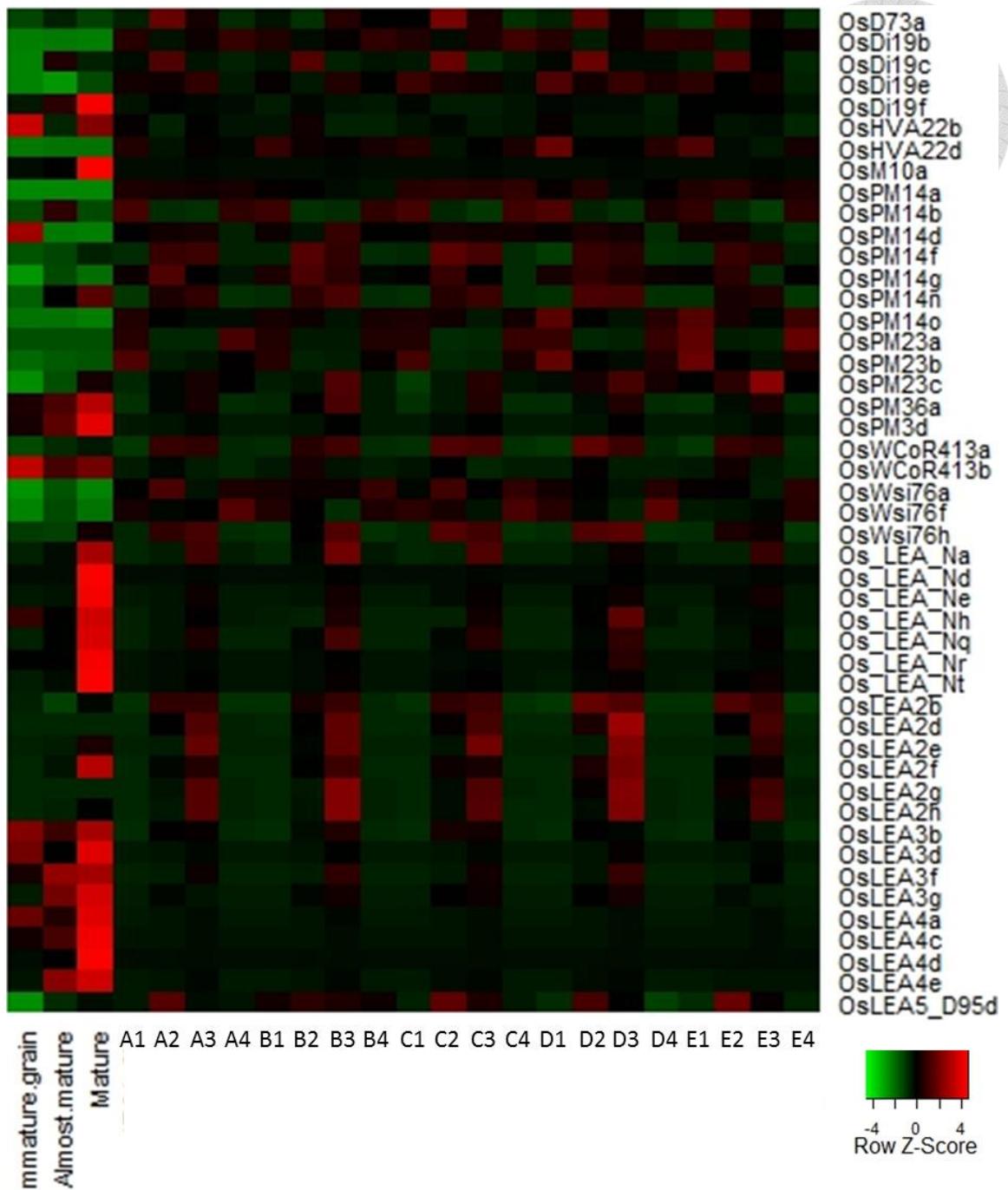


圖 25、LEA 蛋白質在 IR64 種子與五種籼稻地上部中的轉錄體表現

Figure 25. Gene expression of LEA protein in seed of IR64 and shoot of 5 indica rice genotypes

數值為原始基因表現量，A、B、C、D 以及 E 分別表示 IR64、SM13、SM47、HY15 以及 TCN1。1、2、3 以及 4 則表示在 0 hr、3 hr、24 hr 以及復水 24 hr 的時間點

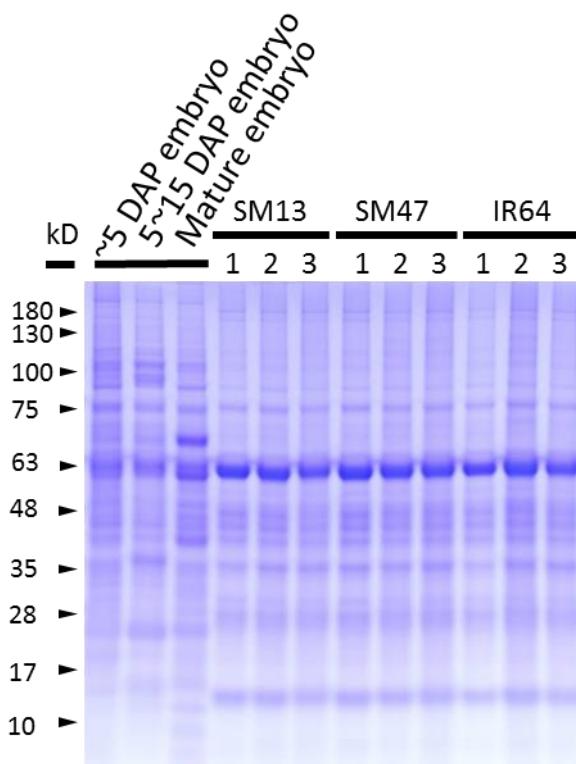


圖 26、IR64 與其突變系地上部在逆境處理下之總蛋白的 SDS-PAGE 分析

Figure 26. SDS-PAGE of total soluble proteins of IR64 and its mutants under drought treatments

每種樣品的總蛋白質均定量為 10 μ g，並且以 12% SDS-PAGE 分離不同分子量之蛋白，詳細流程可參閱材料方法。樣品名稱標註於圖上方，而分子量梯度標幟則列於圖左的 kD 欄位下。IR64 胚的蛋白質樣品由左而右依序為~5 DAP embryo (發育約 5 天的胚)、5~15 DAP embryo (發育 5 至 15 天的胚) 以及成熟之胚。編號 1 表示控制組之地上部；編號 2 表示 PEG 6000 處理 24 小時之地上部；編號 3 表示復水 24 小時之地上部。

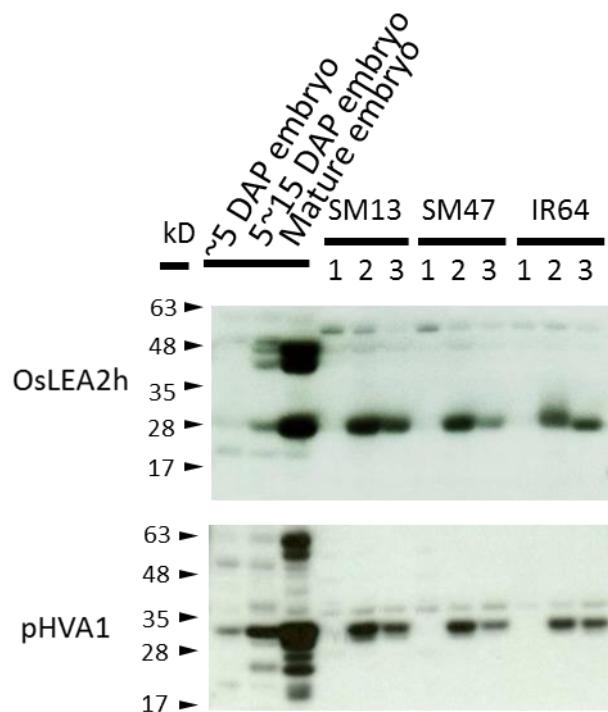


圖 27、以 Western Blot 偵測 IR64 與其突變系地上部在逆境處理下之 LEA 蛋白質累積量

Figure 27. Immunoblot detection of OsLEA 2h and pHVA1 protein accumulation in IR64 and its mutants under drought treatments

每種樣品的總蛋白質均定量為 10 μ g，並且以 12% SDS-PAGE 分離不同分子量之蛋白，接著分別針對 OsLEA2h 及 pHVA1 進行 Western Blot，詳細流程可參閱材料方法。樣品名稱標註於圖上方，而分子量梯度標幟則列於圖左的 kD 欄位下。IR64 胚的蛋白質樣品由左而右依序為~5 DAP embryo (發育約 5 天的胚)、5~15 DAP embryo (發育 5 至 15 天的胚) 以及成熟之胚。編號 1 表示控制組之上部；編號 2 表示 PEG 6000 處理 24 小時之上部；編號 3 表示復水 24 小時之上部。

參考文獻

吳永培。2013。利用 IR64 突變庫篩選耐旱水稻之研究。台灣農業研究。62: 195-208。

邱啟洲。1997。胺基酸類似物誘導大豆第一族低分子量熱休克蛋白質生合成之生理生化分析及其與耐熱性的探討。國立台灣大學植物學系碩士論文：pp 8-12。

王泳傑。2013。比較水稻 IR64 耐旱突變系之生理反應及其相關基因表現。國立台灣大學農藝學系碩士論文：pp 54。

莊榮輝 主編。2005。酵素化學實驗。台灣大學生化科技學系。

Abe, H., T. Urao, T. Ito, M. Seki, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2003. *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* 15: 63-78.

Adler, V., Z.M. Yin, K.D. Tew and Z. Ronai. 1999. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene* 18: 6104-6111.

Anders, S. and W. Huber. 2010. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome biology* 11: R106-R106.

Anderson, C.M. and B.D. Kohorn. 2001. Inactivation of *Arabidopsis* *SIP1* leads to reduced levels of sugars and drought tolerance. *J Plant Physiol* 158: 1215-1219.

Aryadeep, R., P. Saikat and B. Supratim. 2013. Cross-talk between abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways during abiotic stress. *Plant Cell Rep* 32: 985-1006.

Baker, J., C. Steele and L. Dure. 1988. Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton. *Plant Molecular Biology* 11: 277-291.

Bartels, D., M. Singh and F. Salamini. 1988. Onset of desiccation tolerance during development of the barley embryo. *Planta* 175: 485-492.

Basu, S., A. Roychoudhury, P.P. Saha and D.N. Sengupta. 2010. Comparative analysis of some biochemical responses of three indica rice varieties during polyethylene glycol-mediated water stress exhibits distinct varietal differences. *Acta Physiol Plant* 32: 551-563.

Bengtsson, H., B. Calder, I.S. Mian, M. Callow, E. Rubin and T.P. Speed. 2001. Identifying differentially expressed genes in cDNA microarray experiments authors. *Sci Aging Knowledge Environ* 2001: vp8.

Blackman, S.A., S.H. Wettlaufer, R.L. Obendorf and A.C. Leopold. 1991. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. *Plant Physiology* 96: 868-874.

Boston, R.S., P.V. Viitanen and E. Vierling. 1996. Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Mol Biol* 32: 191-222.

Bowman, J.L. 2000. The YABBY gene family and abaxial cell fate. *Curr Opin Plant Biol* 3: 17-22.

Boyer, J.S. 1982. Plant productivity and environment. *Science* 218: 443-448.

Bridger, G.L. and N.K. Alfrey. 1964. Process for production of non-burning fertilizer. U.S. Patent No. 3,125,411. Washington, DC: U.S.

Broker, C., M. Vasilou, S. Carpenter, C. Carpenter, Y. Zhang, X. Wang, *et al.* 2013. Aldehyde dehydrogenase (ALDH) superfamily in plants: gene nomenclature and comparative genomics. *Planta* 237: 189-210.

Cabib, E. and L.F. Leloir. 1958. The biosynthesis of trehalose phosphate. *J Biol Chem* 231: 259-275.

Chaves, M.M., J.P. Maroco and J.S. Pereira. 2003. Review : understanding plant responses to drought — from genes to the whole plant. *Functional plant biology* 30: 239-264.

Chaves, M.M. and M.M. Oliveira. 2004. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany* 55: 2365-2384.

Chen, Y., L.Q. Qu and X. Jia. 2003. The characters and gene expression of rice seed proteins. *Hereditas* 25: 367-372.

Cingolani, P., A. Platts, L.L. Wang, M. Coon, T. Nguyen, L. Wang, *et al.* 2012. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118 ; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)*: 80-92.

Cui, X., P. Jin, X. Cui, L. Gu, Z. Lu, Y. Xue, *et al.* 2013. Control of transposon activity by a histone H3K4 demethylase in rice. *P Natl Acad Sci USA* 110: 1953-1958.

Dai, M.Q., Y. Zhao, Q.F. Ma, Y. Hu, P.F. Hedden, Q. Zhang, *et al.* 2007. The rice YABBY1 gene is involved in the feedback regulation of gibberellin metabolism. *Plant Physiol* 144: 121-133.

Das, S., A. Bose and B. Ghosh. 1995. Effect of salt stress on polyamine metabolism in *Brassica campestris*. *Phytochemistry* 39: 283-285.

Davies, P.J. 2011. Plant hormone. 3 ed. Springer, Netherlands.

Degenkolbe, T., P.T. Do, E. Zuther, D. Repsilber, D. Walther, D.K. Hincha, *et al.* 2009. Expression profiling of rice cultivars differing in their tolerance to long-term drought stress. *Plant Mol Biol* 69: 133-153.

Delseny, M., B. Han and Y. Hsing. 2010. High throughput DNA sequencing: The new sequencing revolution. *Plant Sci* 179: 407-422.

Diedhiou, C.J., O.V. Popova, K.J. Dietz and D. Golldack. 2008. The SNF1-type serine-threonine protein kinase SAPK4 regulates stress-responsive gene

expression in rice. *BMC Plant Biol* 8.

Doubnerová, V. and H. Ryšlavá. 2011. What can enzymes of C₄ photosynthesis do for C₃ plants under stress? *Plant Science : an international journal of experimental plant biology* 180: 575-583.

Doubnerova Hyskova, V., L. Miedzinska, J. Dobra, R. Vankova and H. Ryslava. 2014. Phosphoenolpyruvate carboxylase, NADP-malic enzyme, and pyruvate, phosphate dikinase are involved in the acclimation of *Nicotiana tabacum* L. to drought stress. *J Plant Physiol* 171: 19-25.

Du, H., L.H. Liu, L. You, M. Yang, Y.B. He, X.H. Li, *et al.* 2011. Characterization of an inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase gene that is essential for drought and salt stress responses in rice. *Plant Mol Biol* 77: 547-563.

Dubouzet, J.G., Y. Sakuma, Y. Ito, M. Kasuga, E.G. Dubouzet, S. Miura, *et al.* 2003. *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant Journal* 33: 751-763.

Dunn, M.F., J.A. Ramirez-Trujillo and I. Hernandez-Lucas. 2009. Major roles of isocitrate lyase and malate synthase in bacterial and fungal pathogenesis. *Microbiology* 155: 3166-3175.

Dure, L., M. Crouch, J. Harada, T.H.D. Ho, J. Mundy, R. Quatrano, *et al.* 1989. Common amino acid sequence domains among the Lea proteins of higher plants. *Plant Molecular Biology* 12: 475-486.

Eastmond, P.J., V. Germain, P.R. Lange, J.H. Bryce, S.M. Smith and I.A. Graham. 2000. Postgerminative growth and lipid catabolism in oilseeds lacking the glyoxylate cycle. *P Natl Acad Sci USA* 97: 5669-5674.

Ernst, J. and Z. Bar-Joseph. 2006. STEM: a tool for the analysis of short time series gene expression data. *BMC Bioinformatics* 7: 191-191.

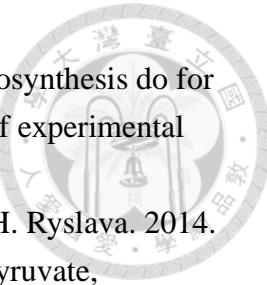
Flores, H., F. Campos, R.C. Araujo and B.A. Underwood. 1984. Assessment of marginal vitamin A deficiency in Brazilian children using the relative dose response procedure. *Am J Clin Nutr* 40: 1281-1289.

Fukai, S., G. Pantuwan, B. Jongdee and M. Cooper. 1999. Screening for drought resistance in rainfed lowland rice. *Field Crops Research* 64: 61-74.

Furihata, T., K. Maruyama, Y. Fujita, T. Umezawa, R. Yoshida, K. Shinozaki, *et al.* 2006. Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *P Natl Acad Sci USA* 103: 1988-1993.

Gao, C.X. and B. Han. 2009. Evolutionary and expression study of the aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily in rice (*Oryza sativa*). *Gene* 431: 86-94.

Garber, M., M.G. Grabherr, M. Guttman and C. Trapnell. 2011. Computational



methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. *Nat Methods* 8: 469-477.

Garg, A.K., J.K. Kim, T.G. Owens, A.P. Ranwala, Y. Do Choi, L.V. Kochian, *et al.* 2002. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *P Natl Acad Sci USA* 99: 15898-15903.

Gilmour, S.J., D.G. Zarka, E.J. Stockinger, M.P. Salazar, J.M. Houghton and M.F. Thomashow. 1998. Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced *COR* gene expression. *Plant Journal* 16: 433-442.

Goddijn, O.J., T.C. Verwoerd, E. Voogd, R.W. Krutwagen, P.T. de Graaf, K. van Dun, *et al.* 1997. Inhibition of trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. *Plant Physiol* 113: 181-190.

Good, A.G. and S.T. Zaplachinski. 1994. The effects of drought stress on free amino acid accumulation and protein synthesis in *Brassica napus*. *Physiologia Plantarum* 90: 9-14.

Griffiths, J., K. Murase, I. Rieu, R. Zentella, Z.L. Zhang, S.J. Powers, *et al.* 2007. Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 726-726.

Hadiarto, T. and L.S. Tran. 2011. Progress studies of drought-responsive genes in rice. *Plant Cell Rep* 30: 297-310.

Harlow, E. and D. Lane. 1988. Antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory

Hirano, K., M. Ueguchi-Tanaka and M. Matsuoka. 2008. GID1-mediated gibberellin signaling in plants. *Trends Plant Sci* 13: 192-199.

Hong Bo, S., L. Zong Suo and S. Ming An. 2005. LEA proteins in higher plants: structure, function, gene expression and regulation. *Colloids Surf B Biointerfaces* 45: 131-135.

Hsing, Y.I.C., R.W. Rinne, A.G. Hepburn and R.E. Zielinski. 1990. Expression of maturation-specific genes in soybean seeds. *Crop Science* 30: 1343-1350.

Hsing, Y.I.C. and S.J. Wu. 1992. Cloning and characterization of cDNA clones encoding soybean seed maturation polypeptides. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 33: 191-199.

Hu, H., M. Dai, J. Yao, B. Xiao, X. Li, Q. Zhang, *et al.* 2006. Transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *P Natl Acad Sci USA* 1.

Imai, R., L. Chang, A. Ohta, E.A. Bray and M. Takagi. 1996. A Lea-class gene of tomato confers salt and freezing tolerance when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 170: 243-248.

Ingram, J. and D. Bartels. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in

plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 377-403.

IRRI. 1980. Standard evaluation system for rice (SES). International Rice Research Institute, Los Bafios, Philippines.

IRRI. 1982. Drought resistance in crops with emphasis on rice. International Rice Research Institute, Los Bafios, Philippines.

Ismail, A.M., A.E. Hall and T.J. Close. 1997. Chilling tolerance during emergence of cowpea associated with a dehydrin and slow electrolyte leakage. *Crop Science* 37: 1270-1277.

Jang, I.C., S.J. Oh, J.S. Seo, W.B. Choi, S.I. Song, C.H. Kim, *et al.* 2003. Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth. *Plant Physiol* 131: 516-524.

Jeong, J.S., Y.S. Kim, K.H. Baek, H. Jung, S.-H. Ha, Y. Do Choi, *et al.* 2010. Root-specific expression of *OsNAC10* improves drought tolerance and grain yield in rice under field drought conditions. *Plant Physiol* 153: 185-197.

Jones, L. and S. McQueen Mason. 2004. A role for expansins in dehydration and rehydration of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *FEBS Lett* 559: 61-65.

Karp, P.D., S.M. Paley, M. Krummenacker, M. Latendresse, J.M. Dale, T.J. Lee, *et al.* 2010. Pathway Tools version 13.0: integrated software for pathway/genome informatics and systems biology. *Brief Bioinform* 11: 40-79.

Kasuga, M., Q. Liu, S. Miura, K. Yamaguchi Shinozaki and K. Shinozaki. 1999. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat Biotechnol* 17: 287-291.

Kawasaki, S., C. Borchert, M. Deyholos, H. Wang, S. Brazille, K. Kawai, *et al.* 2001. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell* 13: 889-905.

Kikawada, T., Y. Nakahara, Y. Kanamori, K. Iwata, M. Watanabe, B. McGee, *et al.* 2006. Dehydration-induced expression of LEA proteins in an anhydrobiotic chironomid. *Biochem Biophys Res Commun* 348: 56-61.

Kim, J.S., H.M. Park, S. Chae, T.H. Lee, D.J. Hwang, S.D. Oh, *et al.* 2014. A pepper *MSRB2* gene confers drought tolerance in rice through the protection of chloroplast-targeted genes. *Plos One* 9.

Koch, K.E. 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 509-540.

Koslowsky, S., H. Riegler, E. Bergmuller and R. Zrenner. 2008. Higher biomass accumulation by increasing phosphoribosylpyrophosphate synthetase activity in



Arabidopsis thaliana and *Nicotiana tabacum*. Plant Biotechnol J 6: 281-294.

Kushwaha, H.R., A.K. Singh, S.K. Sopory, S.L. Singla Pareek and A. Pareek. 2009. Genome wide expression analysis of CBS domain containing proteins in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh and *Oryza sativa* L. reveals their developmental and stress regulation. BMC Genomics 10.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage. Nature.

Lenka, S.K., A. Katiyar, V. Chinnusamy and K.C. Bansal. 2011. Comparative analysis of drought-responsive transcriptome in Indica rice genotypes with contrasting drought tolerance. Plant Biotechnol J 9: 315-327.

Li, Z. k. and J. l. Xu. 2007. Breeding for drought and salt tolerant rice (*Oryza sativa* L.): progress and perspectives. In: M. A. Jenks, P. M. Hasegawa and S. M. Jain, editors, Netherlands. p. 531-564.

Lian, H.L., X. Yu, Q. Ye, X. Ding, Y. Kitagawa, S.S. Kwak, *et al.* 2004. The role of aquaporin RWC3 in drought avoidance in rice. Plant Cell Physiol 45: 481-489.

Lisar, S.Y.S., R. Motafakkerazad, M.M. Hossain and I.M.M. Rahman. 2012. Water Stress, Prof. Ismail Md. Mofizur Rahman (Ed.): ISBN-978-953-307-963-9. In Tech.

Liu, S., Y. Cheng, X. Zhang, Q. Guan, S. Nishiuchi, K. Hase, *et al.* 2007. Expression of an NADP-malic enzyme gene in rice (*Oryza sativa* L) is induced by environmental stresses; over-expression of the gene in *Arabidopsis* confers salt and osmotic stress tolerance. Plant Mol Biol 64: 49-58.

Liu, W.Y., M.M. Wang, J. Huang, H.J. Tang, H.X. Lan and H.S. Zhang. 2009. The *OsDHODH1* gene is involved in salt and drought tolerance in rice. Journal of Integrative Plant Biology 51: 825-833.

Lu, P.I. 2013. Physiological functional analysis of a stress - induced protein , HVA22 , in *Escherichia coli*. 1: 14-23.

Luna, M., M. Badiani, M. Felici, F. Artemi and G.G. Sermanni. 1985. Selective enzyme inactivation under water-stress in maize (*Zea mays* L.) and Wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. Environmental and Experimental Botany 25: 153-156.

Lyu, J.I., S.R. Min, J.H. Lee, Y.H. Lim, J.K. Kim, C.H. Bae, *et al.* 2013. Overexpression of a trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase fusion gene enhances tolerance and photosynthesis during drought and salt stress without growth aberrations in tomato. Plant Cell Tissue and Organ Culture 112: 257-262.

Magome, H., S. Yamaguchi, A. Hanada, Y. Kamiya and K. Oda. 2008. The DDF1 transcriptional activator upregulates expression of a gibberellin-deactivating gene, *GA2ox7*, under high-salinity stress in *Arabidopsis*. Plant Journal 56:

Maqbool, S.B., H. Zhong, Y. El-Maghraby, A. Ahmad, B. Chai, W. Wang, *et al.* 2002. Competence of oat (*Avena sativa* L.) shoot apical meristems for integrative transformation, inherited expression, and osmotic tolerance of transgenic lines containing HVA1. *Theoretical and Applied Genetics* 105: 201-208.

Maruyama, K., K. Urano, K. Yoshiwara, Y. Morishita, N. Sakurai, H. Suzuki, *et al.* 2014. Integrated analysis of the effects of cold and dehydration on rice metabolites, phytohormones, and gene transcripts. *Plant Physiol* 164: 1759-1771.

Matsumoto, T., J.Z. Wu, H. Kanamori, Y. Katayose, M. Fujisawa, N. Namiki, *et al.* 2005. The map-based sequence of the rice genome. *Nature* 436: 793-800.

Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7: 405-410.

Moons, A., G. Bauw, E. Prinsen, M. Van Montagu and D. Van der Straeten. 1995. Molecular and physiological responses to abscisic acid and salts in roots of salt-sensitive and salt-tolerant Indica rice varieties. *Plant Physiol* 107: 177-186.

Moons, A., A. De Keyser and M. Van Montagu. 1997. A group 3 LEA cDNA of rice, responsive to abscisic acid, but not to jasmonic acid, shows variety-specific differences in salt stress response. *Gene* 191: 197-204.

Morillon, R. and M.J. Chrispeels. 2001. The role of ABA and the transpiration stream in the regulation of the osmotic water permeability of leaf cells. *P Natl Acad Sci USA* 98: 14138-14143.

Mortazavi, A., B.A. Williams, K. McCue, L. Schaeffer and B. Wold. 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods* 5: 621-628.

Nakashima, K., T. Kiyosue, K. YamaguchiShinozaki and K. Shinozaki. 1997. A nuclear gene, *erd1* encoding a chloroplast-targeted Clp protease regulatory subunit homolog is not only induced by water stress but also developmentally up-regulated during senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 12: 851-861.

Nookaew, I., M. Papini, N. Pornputtapong, G. Scalcinati, L. Fagerberg, M. Uhlen, *et al.* 2012. A comprehensive comparison of RNA-Seq-based transcriptome analysis from reads to differential gene expression and cross-comparison with microarrays: a case study in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* 40: 10084-10097.

O'Leary, B., J. Park and W.C. Plaxton. 2011. The remarkable diversity of plant PEPC (phosphoenolpyruvate carboxylase): recent insights into the physiological functions and post-translational controls of non-photosynthetic PEPCs. *Biochem J* 436: 15-34.

Olsen, O., X. Wang and D. von Wettstein. 1993. Sodium azide mutagenesis: preferential generation of A.T->G.C transitions in the barley *Ant18* gene. *P Natl Acad Sci USA* 90: 8043-8047.

Owais, W.M. and a. Kleinhofs. 1988. Metabolic activation of the mutagen azide in biological systems. *Mutat Res* 197: 313-323.

Paul, M.J., L.F. Primavesi, D. Jhurreea and Y.H. Zhang. 2008. Trehalose metabolism and signaling. *Annu Rev Plant Biol* 59: 417-441.

Peleg, Z. and E. Blumwald. 2011. Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Curr Opin Plant Biol* 14: 290-295.

Rabbani, M.A., K. Maruyama, H. Abe, M.A. Khan, K. Katsura, Y. Ito, *et al.* 2003. Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. *Plant Physiol* 133: 1755-1767.

Ramanjulu, S. and D. Bartels. 2002. Drought- and desiccation-induced modulation of gene. *Plant, Cell and Environment* 25: 141-151.

Rathinasabapathi, B., W.M. Fouad and C.A. Siguia. 2001. β -Alanine betaine synthesis in the Plumbaginaceae. Purification and characterization of a trifunctional, *S*-adenosyl-*L*-methionine-dependent *N*-methyltransferase from *Limonium latifolium* leaves. *Plant Physiol* 126: 1241-1249.

Ried, J.L. and M.K. Walker-Simmons. 1993. Group 3 late embryogenesis abundant proteins in desiccation-tolerant seedlings of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol* 102: 125-131.

Romero, C., J.M. Belles, J.L. Vaya, R. Serrano and F.A. Culianez-Macia. 1997. Expression of the yeast trehalose-6-phosphate synthase gene in transgenic tobacco plants: pleiotropic phenotypes include drought tolerance. *Planta* 201: 293-297.

Rosenberg, L.A. and R.W. Rinne. 1989. Protein synthesis during rehydration, germination and seedling growth of naturally and precociously matured soybean seeds (*Glycine Max*). *Annals of Botany* 64: 77-86.

Roy, S.C. and T. Roy. 2013. Peptide mass fingerprinting of rice (*Oryza sativa* L.) leaves during UV-B induced stress at seedling stage : a proteom analysis. *Indian J. Biotechnol* 12: 504-508.

Saeed, A.I., V. Sharov, J. White, J. Li, W. Liang, N. Bhagabati, *et al.* 2003. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 34: 374-378.

Samuel, D., T.K. Kumar, G. Ganesh, G. Jayaraman, P.W. Yang, M.M. Chang, *et al.* 2000. Proline inhibits aggregation during protein refolding. *Protein Sci* 9: 344-352.

Seo, P.J., F. Xiang, M. Qiao, J. Y. Park, Y.N. Lee, S. G. Kim, *et al.* 2009. The MYB96 transcription factor mediates abscisic acid signaling during drought stress response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 151: 275-289.

Shen, Q.X., C.N. Chen, A. Brands, S.M. Pan and T.H.D. Ho. 2001. The stress- and abscisic acid-induced barley gene *HVA22*: developmental regulation and homologues in diverse organisms. *Plant Mol Biol* 45: 327-340.

Shen, Q.X., P.N. Zhang and T.H.D. Ho. 1996. Modular nature of abscisic acid (ABA) response complexes: composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley. *Plant Cell* 8: 1107-1119.

Shih, M.D., F.A. Hoekstra and Y.I.C. Hsing. 2008. Late embryogenesis abundant proteins. *Advances in Botanical Research* 48: 211-255.

Shinozaki, K. and K. Yamaguchi Shinozaki. 2000. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* 3: 217-223.

Singh, K.K. and S. Ghosh. 2013. Regulation of glutamine synthetase isoforms in two differentially drought-tolerant rice (*Oryza sativa* L.) cultivars under water deficit conditions. *Plant Cell Rep* 32: 183-193.

Stepansky, A. and T. Leustek. 2006. Histidine biosynthesis in plants. *Amino Acids* 30: 127-142.

Tabuchi, M., T. Abiko and T. Yamaya. 2007. Assimilation of ammonium ions and reutilization of nitrogen in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany* 58: 2319-2327.

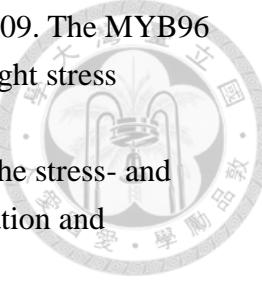
Taji, T., M. Seki, M. Satou, T. Sakurai, M. Kobayashi, K. Ishiyama, *et al.* 2004. Comparative genomics in salt tolerance between *Arabidopsis* and *Arabidopsis*-related halophyte salt cress using *Arabidopsis* microarray. *Plant Physiol* 135: 1697-1709.

Tardieu, F. 2005. Plant tolerance to water deficit: physical limits and possibilities for progress. *C R Geosci* 337: 57-67.

Touchette, B.W., L.R. Jannacone, G.E. Turner and A.R. Frank. 2007. Drought tolerance versus drought avoidance: a comparison of plant-water relations in herbaceous wetland plants subjected to water withdrawal and repletion. *Wetlands* 27: 656-667.

Urao, T., B. Yakubov, R. Satoh, K. Yamaguchi Shinozaki, M. Seki, T. Hirayama, *et al.* 1999. A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *Plant Cell* 11: 1743-1754.

Verelst, W., E. Bertolini, S. De Bodt, K. Vandepoele, M. Demeulenaere, M.E. Pe, *et al.* 2013. Molecular and physiological analysis of growth-limiting drought stress in *Brachypodium distachyon* leaves. *Mol Plant* 6: 311-322.



Vierling, E. 1991. The roles of heat-shock proteins in plants *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42: 579-620.

Vijn, I. and S. Smeekens. 1999. Fructan: more than a reserve carbohydrate? *Plant Physiol* 120: 351-360.

Wang, F.Z., Q.B. Wang, S.Y. Kwon, S.S. Kwak and W.A. Su. 2005. Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase. *J Plant Physiol* 162: 465-472.

Wang, W.X., B. Vinocur and A. Altman. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218: 1-14.

Warnes, A.G.R., B. Bolker, L. Bonebakker, W. Huber, A. Liaw, T. Lumley, *et al.* 2014. Various R programming tools for plotting data Description. The Comprehensive R Archive Network.

Wise, M.J. 2002. The POPPs: clustering and searching using peptide probability profiles. *Bioinformatics* 18 Suppl 1: S38-45.

Xiao, B., Y. Huang, N. Tang and L. Xiong. 2007. Over-expression of a LEA gene in rice improves drought resistance under the field conditions. *Theor Appl Genet* 115: 35-46.

Xie, C., X. Mao, J. Huang, Y. Ding, J. Wu, S. Dong, *et al.* 2011. KOBAS 2.0: a web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases. *Nucleic Acids Research* 39: W316-322.

Xu, D., X. Duan, B. Wang, B. Hong, T.-h.D. Ho and R. Wu. 1996. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol* 110: 249-257.

Xu, W., L. Jia, W. Shi, J. Liang, F. Zhou, Q. Li, *et al.* 2013. Abscisic acid accumulation modulates auxin transport in the root tip to enhance proton secretion for maintaining root growth under moderate water stress. *New Phytol* 197: 139-150.

Yoshida, S., D.A. Forno, J.H. Cock and K.A. Gomez. 1976. Laboratory manual for physiological studies of rice. International Rice Research Institute, Los Bafios, Philippines.

Yoshida, T., Y. Fujita, H. Sayama, S. Kidokoro, K. Maruyama, J. Mizoi, *et al.* 2010. AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *Plant J* 61: 672-685.

Zhang, L., A. Ohta, M. Takagi and R. Imai. 2000. Expression of plant group 2 and group 3 LEA genes in *Saccharomyces cerevisiae* revealed functional divergence among LEA proteins. *Journal of Biochemistry* 127: 611-616.

Zhang, S.W., C.H. Li, J. Cao, Y.C. Zhang, S.Q. Zhang, Y.F. Xia, *et al.* 2009. Altered architecture and enhanced drought tolerance in rice via the down-regulation of indole-3-acetic acid by *TLD1/OsGH3.13* activation. *Plant Physiology* 151: 1889-1901.

Zhao, Z. and S.M. Assmann. 2011. The glycolytic enzyme, phosphoglycerate mutase, has critical roles in stomatal movement, vegetative growth, and pollen production in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 62: 5179-5189.

Zhu, J.K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* 53: 247-273.

Zrenner, R., M. Stitt, U. Sonnewald and R. Boldt. 2006. Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *Annu Rev Plant Biol* 57: 805-836.

附錄 1、木村氏水耕液 (Kimura Solution)



Stock A		in 1 L
500X	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	24.1 g
	KNO_3	9.25 g
	MgSO_4	33.0 g
	KH_2PO_4	12.4 g

Stock B		in 1 L
500X	Fe-citrate	7.50 g
	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	30.0 g
	1N HCl	500 ml

Stock C		in 1 L
10000X	H_3BO_3	1.55 g
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.34 g
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.58 g
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.13 g
	H_2MoO_4	0.08 g

Culture solution	in 1 L
Stock A	1.0 ml
Stock B	1.0 ml
Stock C	0.1 ml

pH : 4.7~4.8

附錄 2、Q-PCR 所使用之引子序列

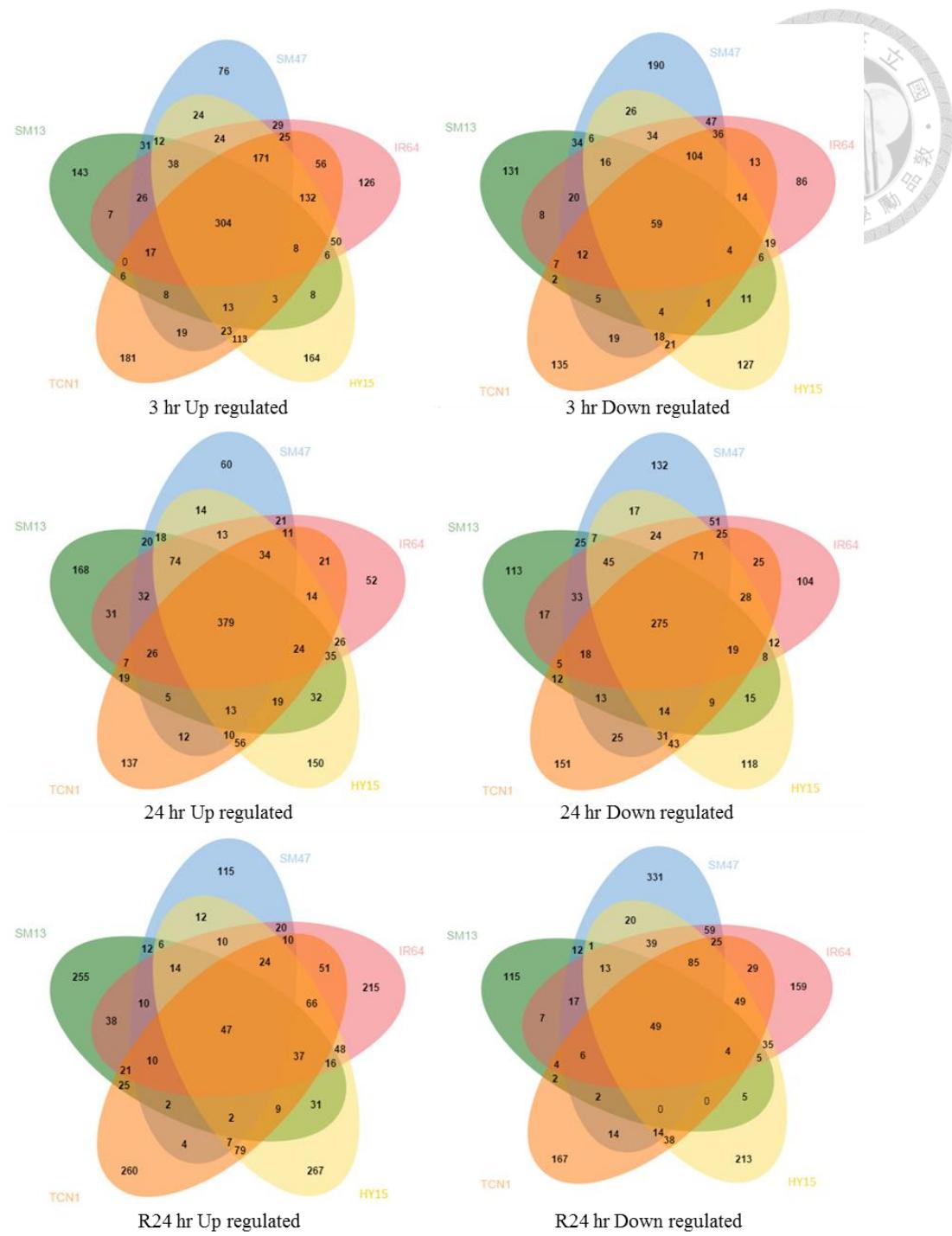
gene	id	sense primer	antisense
<i>OsDREB2</i>	LOC_Os01g071	5'-TGCTGCAGGTCAA	5'-CAGTAAGACGAAAACC
<i>A</i>	20	TAGGAAT-3'	GTAAATGACT-3'
<i>OsNAC6</i>	LOC_Os01g661	5'-GAGCCGCCGGAG	5'-CTCATGCCGCCTTCT
	20	TTGACT-3'	C-3'
Formin	LOC_Os06g111	5'-TGGATAAAATTCCC	5'-GTGTATCCAGTGTGAA
protein	70	TTTCCTGAAAC-3'	AGAGCAAAA-3'

附錄 3、Tris-glycine SDS-PAGE 之分離膠體溶液 (separating buffer) 配方

Components	Gel Volume =>	Volume (ml) of Components Required to Cast Gels of Indicated Volumes and Concentrations							
		5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	40 ml	50 ml
6% gel									
H ₂ O		2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	15.9	21.2	26.5
30% acrylamide mix		1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	8.0	10.0
Tris-Cl (1.5 M, pH 8.8)		1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
SDS (10%)		0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% ammonium persulfate		0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED		0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024	0.032	0.04
8% gel									
H ₂ O		2.3	4.6	6.9	9.3	11.5	13.9	18.5	23.2
30% acrylamide mix		1.3	2.7	4.0	5.3	6.7	8.0	10.7	13.3
Tris-Cl (1.5 M, pH 8.8)		1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
SDS (10%)		0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% ammonium persulfate		0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED		0.003	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018	0.024	0.03
10% gel									
H ₂ O		1.9	4.0	5.9	7.9	9.9	11.9	15.9	19.8
30% acrylamide mix		1.7	3.3	5.0	6.7	8.3	10.0	13.3	16.7
Tris-Cl (1.5 M, pH 8.8)		1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
SDS (10%)		0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% ammonium persulfate		0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED		0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
12% gel									
H ₂ O		1.6	3.3	4.9	6.6	8.2	9.9	13.2	16.5
30% acrylamide mix		2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0	16.0	20.0
Tris-Cl (1.5 M, pH 8.8)		1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
SDS (10%)		0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% ammonium persulfate		0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED		0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
15% gel									
H ₂ O		1.1	2.3	3.4	4.6	5.7	6.9	9.2	11.5
30% acrylamide mix		2.5	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0	20.0	25.0
Tris-Cl (1.5 M, pH 8.8)		1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
SDS (10%)		0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% ammonium persulfate		0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED		0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02

附錄 4、Tris-glycine SDS-PAGE 之焦集膠體溶液 (stacking buffer) 配方

Components	Gel Volume =>	Volume (ml) of Components Required to Cast Gels of Indicated Volumes							
		1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	6 ml	8 ml	10 ml
H ₂ O		0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1	5.5	6.8
30% acrylamide mix		0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1.0	1.3	1.7
Tris-Cl (1.0 M, pH 6.8)		0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	1.0	1.25
SDS (10%)		0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
ammonium persulfate (10%)		0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
TEMED		0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.01



附錄 5、以 venn diagram 分析 SM13、SM47、IR64、HY15 與 TCN1 在乾旱處理下的 DEGs