國立臺灣大學生命科學院生化科技學系

碩士論文

Institute of Biochemical Science and Technology College of Life Science National Taiwan University Master Thesis

阿拉伯芥 Heptahelical Protein 1 參與離層酸造成之

氣孔及主根反應研究

Studies on the Involvement of *Arabidopsis thaliana* Heptahelical Protein 1 in Stoma and Primary Root

Responses to Abscisic Acid

李源芳

Yuan-Fang Li

指導教授:楊健志 博士

Advisor: Chien-Chih Yang, Ph.D.

中華民國一百零一年七月

July 2012



國立臺灣大學生命科學院生化科技學系

碩士論文

Institute of Biochemical Science and Technology College of Life Science National Taiwan University Master Thesis

阿拉伯芥 Heptahelical Protein 1 參與離層酸造成之

氣孔及主根反應研究

Studies on the Involvement of *Arabidopsis thaliana* Heptahelical Protein 1 in Stoma and Primary Root

Responses to Abscisic Acid

李源芳

Yuan-Fang Li

指導教授:楊健志 博士

Advisor: Chien-Chih Yang, Ph.D.

中華民國一百零一年七月

July 2012



中文摘要

為瞭解 HHP1 在離層酸作用的影響及方式,測試突變株 hhp1-1 氣孔對避光處 理、離層酸及其下游訊息分子 H₂O₂ 與一氧化氮的反應,以及離層酸處理主根生 長受抑制的程度。氣孔行為實驗中,避光、離層酸、H₂O₂ 或一氧化氮處理之下, 野生株及 hhp1-1 的氣孔均產生反應而縮小。然而,在光照及避光的處理之下,hhp1-1 氣孔寬度都較野生株為大,顯示 hhp1-1 的氣孔可能有開口較大現象,推測 HHP1 影響保衛細胞離子進出平衡。

三次獨立實驗以離層酸處理的結果再現性不佳,尚不能推測 hhp1-1 的氣孔行為 對離層酸敏感性有何不同。而離層酸訊息傳遞的兩個下游訊息分子 H2O2 及一氧化 氮造成野生株及 hhp1-1 氣孔開口縮小的現象並無顯著差異,因此推測,如果 hhp1-1 的氣孔行為對離層酸較不敏感,HHP1 應是作用於 H2O2 及一氧化氮上游的 訊息傳遞。

主根生長實驗則發現 *hhp1-1* 受離層酸抑制明顯小野生株,因此推測 HHP1 促進離層酸抑制主根生長的生理作用。

本論文的主要發現在於 HHP1 可能參與離層酸抑制主根生長調控,及在離層酸 引發氣孔關閉訊息傳導路徑, HHP1 可能作用於 H₂O₂ 和一氧化氮上游。然而離 層酸處理則因實驗再現性較不穩定,無法推測 *hhp1-1* 氣孔是否有不同的敏感性。 而 HHP1 如何調控離層酸訊息傳遞的生理作用,有待後續實驗釐清。

關鍵字:離層酸、訊息傳遞、氣孔、HHP1、一氧化氮、阿拉伯芥

Abstract

To understand the involvement of HHP1 in ABA responses in this study, stomatal behavior was examined using *hhp1-1* with known stomatal regulator, hydrogen peroxide and nitric oxide. The inhibition of primary root growth by ABA was also examined.

Dark-, ABA-, H_2O_2 -, or NO-induced stomatal closure were observed in both wild-type and *hhp1-1*. The mutant *hhp1-1* was found to have larger stomatal aperture width than wild-type in the absence of regulators, indicating the altered balance of ion strength in guard cells by the loss of HHP1.

The three independent experiments of ABA treatment didn't show good consistency, so it would not be able to tell whether *hhp1-1* stoma has different sensitivity to ABA. The induced stomatal closure by the treatment of H_2O_2 and NO did not show significant differences between wild-type and *hhp1-1* plants. It is suggested that HHP1 acts upstream of H_2O_2 and NO in the signaling of ABA in guard cells, if *hhp1-1* does have less sensitivity in stomatal ABA response.

It was also found that the elongation of primary roots inhibited by ABA is less severe in *hhp1-1* mutants than in wild-type plants, indicating that HHP1 promotes the ABA-induced inhibition of primary root elongation.

HHP1 might be involved in ABA-inhibited primary root growth, and HHP1 might act upstream of H_2O_2 and NO in ABA response in guard cells. Due to the inconsistency in the results of ABA-treated stomatal behavior, the sensitivity of *hhp1-1* to ABA in stomatal response was unknown. Improvement is still required to further investigate how HHP1 regulates the ABA responses in plants.

Keywords: abscisic acid, signal transduction, stoma, heptahelical protein 1, nitric oxide, *Arabidopsis thaliana*

中文摘要I						
AbstractII						
縮寫	『表			.V		
副日	錄			√II		
表E]錄			IX		
第-	第一章 緒論10					
	1.1.	離層	酸一植物生長調節因子	10		
		1.1.1.	離層酸分子性質	10		
		1.1.2.	離層酸訊息傳遞層次	16		
		1.1.3.	氣孔行為調控	22		
		1.1.4.	離層酸調控主根生長	26		
	1.2.	HHP	蛋白質家族與 HHP1	27		
		1.2.1.	表現 HHP1 之組織與誘導表現的因子	27		
		1.2.2.	HHP1 對離層酸及冷逆境訊息傳遞的影響	28		
		1.2.3.	HHP1 與離層酸相關之生理反應	29		
	1.3.	研究	方向	31		
第二	章	材料與フ	方法	32		
	2.1.	植物	材料	32		
		2.1.1.	阿拉伯芥 Arabidopsis thaliana	32		
		2.1.2.	HHP1 基因互補之植株— c-hhp1-1	32		
	2.2.	試劑		33		
		2.2.1.	離層酸	33		
		2.2.2.	過氧化氫	33		
		2.2.3.	亞硝基氰化鈉	33		
		2.2.4.	Stomatal opening buffer	34		
	2.3.	阿拉	伯芥種植	34		

	2.	3.1.	培養介質	34	
	2.	3.2.	生長環境	35	
	2.	3.3.	種子表面滅菌處理及發芽同步化	35	
	2.	3.4.	種子與幼苗移植	35	
2.	.4.	氣孔	關閉實驗	36	
	2.	4.1.	植物下表皮材料	36	
	2.	4.2.	下表皮處理	36	
	2.	4.3.	氣孔開口測量	38	
2.	.5.	離層	酸主根生長抑制實驗	38	
2.	.6.	實驗	結果統計與分析	39	
第三章	15 結	果與詞	寸論	40	
3.	.1.	氣孔	行為實驗	40	
	3.	1.1.	光照下 hhp1-1 氣孔寬度大於野生株	40	
	3.	1.2.	黑暗中 hhp1-1 氣孔寬度大於野生株氣孔	40	
	3.	1.3.	H ₂ O ₂ 處理 <i>hhp1-1</i> 氣孔寬度與野生株氣孔相近	40	
	3.	1.4.	SNP 處理 hhp1-1 氣孔寬度與野生株植株氣孔相近	41	
	3.	1.5.	ABA 處理 hhp1-1 氣孔寬度可能與野生株氣孔相近	41	
	3.	1.6.	hhp1-1 與野生株在氣孔行為的差異	42	
3.	.2.	hhp1	-1 主根生長對於離層酸之抑制作用較野生株不敏感	43	
第四章	重 未?	來展望	夕 三	44	
4.	.1.	植株	氣孔行為探討	44	
4.	.2.	訊息	傳遞物含量及氣孔反應分析	44	
4.	.3.	In vi	vo HHP1 蛋白質特性探討	44	
4.	.4.	離層	酸訊息傳遞成員組成探討	45	
第五章 圖與表					
5.	.1.	氣孔	行為實驗	46	
5.	.2.	主根	生長抑制實驗	57	
參考文獻					
問答集	₹	•••••		66	

縮寫表

AAO3	Arabidopsis aldehyde oxidase 3	
ABA	abscisic acid	
ABA1/2/3	ABA DEFICIENT 1/2/3	
ABI1/2/3/5	ABA insensitive 1/2/3/5	
ABRE	ABA-responsive element	
AHA1/OST2	Arabidopsis H ⁺ ATPase1/open stomata 2	
AHG1/3	ABA hypersensitive germination 1/3	
ANOVA	analysis of variance	
ATP	adenosine 5'-triphosphate	
bZIP	basic leucine zipper	
CDPK	calcium-dependent protein kinase	
CE	coupling element	
cGMP	cyclic guanosine monophosphate	
DAF-2 DA	diaminofluorescein diacetate	
GORK1	gated outwardly-rectifying K ⁺ channel	
GSH	reduced glutathione	
GSNO	nitrosylated glutathione	
H ₂ DCF-DA	2'7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate	
HAB1	hypersensitive to ABA 1	
HHP1	heptahelical protein 1	
KAT1/2	potassium channel in Arabidopsis thaliana 1/2	
LSD	least significant difference	
МАРК	mitogen-activated protein kinase	
MS medium	Murashige and Skoog medium	
nia1/nia2	nitrate reductase1/2	
NOA	nitric oxide associated	
NOS	nitric oxide synthase	

NR	nitrite reductase		
OST1	open stomata 1		
OXI1	oxidative signal-inducible 1		
PCR	Polymerase chain reaction		
PP2C protein phosphatase 2C			
PTIO	2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide		
PYR/PYI /RCAR	pyrabactin resistance / PYR1-like/ regulatory component of ABA		
	receptor		
RbohF/D respiratory burst oxidase homolog F/D			
ROS	reactive oxygen species		
SA	salicylic acid		
SLAC1	slow anion channel associated 1		
SLAH3	SLAC1 homolog 3		
SnRK2	Snf1-related protein kinase2		
TAIR	The Arabidopsis Information Resource		
WT	wild type		



圖目錄

Figure 1-1. The biosynthetic and metabolic pathways of abscisic acid in
Arabidopsis thaliana11
Figure 1-2. ABA transporters in Arabidopsis thaliana
Figure 1-3. The structure and catabolic pathways of (+)-(<i>S</i>)-abscisic acid 15
Figure 1-4. Current model of ABA signaling 17
Figure 1-5. Network of transcriptional regulation by ABA via ABI5 and
AREBs
Figure 1-6. Integrated network of ABA biosynthesis, signaling and the protein
interactions in Arabidopsis thaliana
Figure 1-7. The important ion channels and proteins involved in stomatal
behavior
Figure 1-8. Regulatory network in guard cell in stomatal closure
Figure 1-9. Seed germination rates of WT, hhp1-1, and c-hhp1-1under ABA
treatment
Figure 1-10. Stomatal width/height ratio of WT, hhp1-1, and c-hhp1-1under
ABA treatment

Figure 5-1. Width of stomata from epidermis incubated under light for 5 hours.
Figure 5-2. Lower epidermis of WT (left) and <i>hhp1-1</i> (right) under control
condition
Figure 5-3. Width of stomata from epidermis incubated under light for 2.5
hours, and then covered with aluminum foil to be sheltered from light for
another 2.5 hours
Figure 5-4. Lower epidermis of WT (left) and hhp1-1 (right) incubated in
darkness for 2.5 hours
Figure 5-5. Width of stomata from epidermis incubated under light for 2.5
hours, followed by treatment of 100 μ M H ₂ O ₂ for another 2.5 hours 50

Figure 5-6. Lower epidermis of WT (left) and <i>hhp1-1</i> (right) incubated in 100
$\mu M~H_2O_2$ for 2.5 hours
Figure 5-7. Width of stomata from epidermis incubated under light for 2.5
hours, followed by treatment of 50 μ M SNP for another 2.5 hours 52
Figure 5-8. Lower epidermis of WT (left) and <i>hhp1-1</i> (right) incubated in 50
μM SNP for 2.5 hours
Figure 5-9. Width of stomata from the epidermis treated with 0, 1, 10 μ M
ABA for 2.5 hours (A), (B), (C). Ratio of stomatal width from the same
replicates (D), (E), (F), results of 0 µM ABA were set at 100%55
Figure 5-10. Lower epidermis of WT (left) and <i>hhp1-1</i> (right) incubated in 10
μM ABA for 2.5 hours
Figure 5-11. ABA inhibition of primary root growth of WT and <i>hhp1-1</i> 57
Figure 5-12. Arabidopsis seedlings transferred to 1/2 MS medium containing
0 μ M ABA (left), and 10 μ M ABA (right) for 6 days. The edge of
squares is 1.35 cm



表目錄

Table 1-1 Enzymes involved in ABA biosynthesis in Arabidopsis thaliana,								
and the phenotype of null mutants						12		
Table	1-2	PYR/PYL/RCAR	and	their	PP2C	interacting	partners	in
Arabidopsis thaliana18								



第一章 緒論

1.1. 離層酸—植物生長調節因子

離層酸 abscisic acid (ABA) 可調控植物在生長發育過程中許多重要的生理反應, 如氣孔關閉、促進種子成熟及休眠、抑制種子萌發及幼苗發育等。除生長與發育 外,植物在遭遇許多不同非生物性逆境,如乾旱、滲透壓、低溫時,常藉由 ABA 調控上述生理作用以適應逆境。

1.1.1. 離層酸分子性質

1.1.1.1.生成及運輸

以阿拉伯芥為例,主要的 ABA 生合成路徑可追溯至上游玉米黃素 (zeaxanthin), 經 ABA1 及 ABA4 作用得 9'-cis-neoxanthin, 經 nine-cis-epoxy-carotenoid dioxygenases (NCEDs) 作用成 xanthoxin, 再由 ABA2 (ABA deficient 2) 作用得 abscisic aldehyde,最後經 AAO3 (*Arabidopsis* aldehyde oxidase 3)將之氧化為 abscisic acid (Figure1-1.1) (Nambara and Marion-Poll, 2005)。阿拉伯芥中缺失 ABA 生合成酵素的突變株往往在乾旱、滲透壓或種子萌發有異常的反應,例如野生株 阿拉伯芥的種子在 10% (w/v) 蔗糖的高滲透壓培養基培養時無法正常發芽,而 ABA1 缺失的種子在相同培養基之中卻能發芽 (Koornneef et al., 1982);其他突變 株如缺失 ABA2、ABA3 或 AAO3 者在缺水時容易枯萎,被推測是因為無法生合 成 ABA 而缺乏對氣孔行為的調控,造成水份大量流失 (Leon-Kloosterziel et al., 1996; Seo et al., 2000; Rook et al., 2001)。



Figure 1-1. The biosynthetic and metabolic pathways of abscisic acid in *Arabidopsis* thaliana

Enzymes and organelles involved are shown (Nambara and Marion-Poll, 2005).

Table 1-1 Enzymes involved in ABA biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*, and the phenotype of null mutants

名稱	酵素活性	功能缺失突變株性狀
ABA1/	Zeaxanthin	内生性 ABA 不足、凋萎、
NPQ2/LOS6	epoxidase (ZEP)	stress-/ABA-induced genes 表現低落、
		幼苗可生長於高糖逆境
ABA2/	Short-chain alcohol	内生性 ABA 不足、凋萎、
GIN1/ISI4/SIS4	dehydrogenase	stress-/ABA-induced genes 表現低落、
		幼苗可生長於高糖逆境
ABA3/	MoCo sulfurase	内生性 ABA 不足、凋萎、
LOS5/GIN5		stress-/ABA-induced genes 表現低落、
		幼苗可生長於高糖逆境、對低溫敏感
AAO3	Abscisic aldehyde	内生性 ABA 不足、凋萎
	oxidase	序列 1.1

(Koornneef *et al.*, 1982; Leon-Kloosterziel *et al.*, 1996; Seo *et al.*, 2000; Rook *et al.*, 2001; Schwartz and Zeevaart, 2010)

Endo 等與 Koiwai 等以免疫組織染色的方式,發現參與 ABA 生合成的關鍵酵素 AtNCED,在植株缺水時會被表現於維管束薄壁細胞,水份充足時則不會觀察 到 AtNCED3 表現;而另外 ABA 生合成最後兩個酵素 ABA2 和 AAO3 被發現 在維管束薄壁細胞中穩定表現,而 ABA2 在根部有強烈的表現,因此推測薄壁組 織是植物 ABA 生合成的重要部位,在缺水或滲透壓逆境等因子誘發下生成 ABA (Cheng *et al.*, 2002; Koiwai *et al.*, 2004; Endo *et al.*, 2008)。

目前認為 ABA 運輸主要經由 ATP-binding cassette (ABC) transporter 的方式進行。 在阿拉伯芥中已知和 ABA 運輸有關的蛋白質有 AtABCG25 (AtWBC26) 和 AtABCG40,兩者皆為 ABC transporter。AtABCG25 廣泛表現於維管束組織中, 藉水解 ATP 輸出 ABA,使 ABA 可經由維管束運送,並被輸出至 apoplastic space (Kang et al., 2010); AtABCG40 表現於主根、側根,在葉片中則以保衛細胞 表現量最高,藉著水解 ATP 向胞內輸入 ABA,以達成 ABA 對氣孔行為的調節 (Kuromori et al., 2010),缺失 AtABCG40 的突變株被指出在 ABA 處理後的 ABA-induced 基因表現,以及氣孔反應都有延遲的現象,顯示有不正常的 ABA 運 輸 (Kang et al., 2010)。



Figure 1-2. ABA transporters in Arabidopsis thaliana



1.1.1.2. 離層酸異構物及其代謝

植物中僅會生成 (+)-(S)-ABA,而在植物組織培養時若使用化學合成的 ABA, 有可能是 (+)-(S)-ABA 與 (-)-(R)-ABA 的混合物。兩者在植物中被指出有不同的生 理活性,Walker-Simmons 等以 (+)-(S)-ABA 與 (-)-(R)-ABA 分別進行處理,發現 (+)-(S)-ABA 與 (-)-(R)-ABA 對小麥種子萌發的抑制能力相當,促進小麥中 ABA-responsive 基因 group 3 lea 表現的能力也相近;但對於另一群 ABA-responsive 基因 *dhn* (*rab*)及 *Em* 的表現, (+)-(S)-ABA 的促進能力則明顯高於 (-)-(R)-ABA (Walker-Simmons *et al.*, 1992), 不同的調控結果, 顯示多種 ABA 受體 及調控路徑存在的可能性。

Lin 等發現,對 *Marsilea quadrifola* 進行 (-)-(*R*)-ABA 處理,會造成 (+)-(*S*)-ABA 與其代謝物 phaseic acid (PA) 含量上升,因此推測 (-)-(*R*)-ABA 可能 有促進 (+)-(*S*)-ABA 生成的活性,而 (-)-(*R*)-ABA 的活性機制可能源自於較不易被 植物體代謝的特性,以及被促進的 (+)-(*S*)-ABA 生成 (Lin *et al.*, 2005)。

Zhou 等發現,(+)-(S)-ABA 在植物代謝的第一個反應是在 7'、8'或9'-碳上進行 hydroxylation,7'、8'及9'-碳的 hydroxylation 產物都保有部份 ABA 活性,但 8'-OH ABA 及 9'-OH ABA 仍可繼續進行環化,分別形成 PA 及不具 ABA 活性的 neo-phaseic acid (neo-PA)。目前 7'-OH ABA 及 neo-PA 的下游代謝產物及路徑尚未 被發現,但 8'-OH ABA 及 PA 在植物體中可被繼續修飾。

目前植物中 ABA的 8'- hydroxylation 由一種 cytochrome P450 monooxygenase 8' hydroxylase 進行 (Krochko *et al.*, 1998; Saito *et al.*, 2004),此一修飾被認為可促進後 續代謝反應,並藉由後續修飾改變 ABA 衍生物的 ABA 活性及在胞器的儲存特性 (Zou *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 2004)。然而對於其他 ABA 代謝路徑、不同組織的代 謝偏好,及各產物之 ABA 活性仍所知有限。



Figure 1-3. The structure and catabolic pathways of (+)-(*S*)-abscisic acid (Zaharia *et al.*, 2005)

1.1.1.3. 離層酸類似物

ABA 類似物被廣泛用於 ABA 生理反應的研究,如植物 ABA 處理及 ABA 訊息 傳遞的研究。由於 ABA 處理時,進行處理的 ABA 可能因植物本身代謝酵素作用 而失效或流失,Abrams 及研究團隊於 ABA 的 8'-碳上進行化學修飾而得到 ABA 類似物 8'-methylene-ABA,發現 8'-methylene-ABA 對於水芹種子萌發及玉米懸浮 培養細胞生長,都有較持久的抑制作用,推測是 8'-methylene-ABA 無法正常進行 ABA 8'-hydroxylation,而得以維持生理活性達較長時間 (Abrams *et al.*, 1997)。目 前被廣為接受的 ABA 受體 pyrabactin resistance (PYR) / PYR1-like/ regulatory component of ABA receptor (PYR/PYL/RCAR) 則是使用一種可抑制種子萌芽的 ABA 類似物 pyrabactin 進行突變株篩選而發現者 (Park *et al.*, 2009)。

1.1.2. 離層酸訊息傳遞層次

1.1.2.1. 離層酸訊息傳遞核心

ABA 調控許多不同生理反應,然而對於其完整訊息調控網絡仍所知有限。目前 被接受的 ABA 受器 PYR/PYL/RCAR 蛋白質家族,其成員具有與ABA 結合能力, 且能結合與調控 group A type 2C serine threonine protein phosphatase (PP2C) 蛋白 質家族成員活性 (Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009)。

ABA 濃度不足時,PP2C 蛋白質家族藉由與 subfamily 2 Snf1-related kinases (SnRK2) 蛋白質家族結合,形成不具激酶活性的蛋白質複合體,且將之去磷酸化以抑制 SnRK2 活性 (Nishimura *et al.*, 2010);當 ABA 濃度充足時,大部份 PYR/PYL/RCAR 蛋白質家族的成員能與 ABA 結合,進而發生構形變化,以結合 PP2C 的方式瓦解 PP2C-SnRK2 蛋白質複合體,使 SnRK2 得以被磷酸化而產生激 酶活性,以磷酸化的作用達成下游作用蛋白質的功能調控 (Fujii *et al.*, 2009)(參見 Figure 1.1 4)。然而 SnRK2 從複合體游離的方式,及如何在游離後被磷酸化,仍未 有定論;也有研究指出有些 PYR/PYL/RCAR 蛋白質家族成員,即使在 ABA 濃度 低時仍保持與特定 PP2C 蛋白質家族成員結合的狀態 (Nishimura *et al.*, 2010)。



ABA 受器 PYR1 之發現,是以 ABA 類似物 pyrabactin 篩選出對其抑制種子萌 發之作用不敏感突變株,再藉由序列比對、PP2C ABA insensitive 1 (ABI1) 免疫共 沉澱實驗及 pyrabactin/ABA 結合實驗等,發現阿拉伯芥基因組中 PYR/PYL/RCAR 蛋白質家族成員多達 14 個;藉由蛋白質交互作用及序列比對亦歸納出 PP2C 家 族成員 9 個 (Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009), SnRK2 家族成員 10 個。

由典型的 ABA 反應突變株篩選,所發現的過度敏感或不敏感突變株,中受突 變影響的蛋白質,有許多被指出是 PP2C或 SnRK2家族成員,例如 PP2C 有 ABA insensitive 1 (ABI1)、ABA insensitive 2 (ABI2)、hypersensitive to ABA 1 (HAB1)、 ABA hypersensitive germination 3 (AHG3)等,是經由 ABA 種子萌發抑制篩選出 者,而 SnRK2 如 open stomata 1 (OST1/ SnRK2.6)則是經由 ABA 處理的氣孔行 為篩選出。

Table 1-2 PYR/PYL/RCAR and their PP2C interacting partners in *Arabidopsis thaliana*

RCAR	PRR/PYL	PP2C Interacting partners
RCAR1	PYL9	ABI1, ABI2, HAB1
RCAR2	PYL7	ABI1
RCAR3	PYL8	HAB1, ABI1
RCAR4	PYL10	ABI1
RCAR5	PYL11	HAB1, ABI1
RCAR6	PYL12	PP2CA/AHG3
RCAR7	PYL13	-
RCAR8	PYL5	HAB1, ABI1
RCAR9	PYL6	ABI1, ABI2, HAB1
RCAR10	PYL4	HAB1, ABI1
RCAR11	PYR1	HAB1, ABI1
RCAR12	PYL1	HAB1, ABI1
RCAR13	PYL3	HAB1
RCAR14	PYL2	HAB1

adapted from (Joshi-Saha et al., 2011a)

(Ma et al., 2009; Melcher et al., 2009; Miyazono et al., 2009; Nishimura et al., 2009; Park et al., 2009; Santiago et al., 2009a; Santiago et al., 2009b; Yin et al., 2009; Nishimura et al., 2010; Joshi-Saha et al., 2011a)

1.1.2.2. SnRK2 調控的轉錄調控因子

被活化的 SnRK2 可藉由磷酸化目標受質,調控下游目標物的活性。受 SnRK2 調控的蛋白質種類繁多,包括轉錄調控因子、離子通道等。

據估計,阿拉伯芥表現蛋白質的基因大約十分之一會受到 ABA 的作用調節 (Nemhauser *et al.*, 2006)。而研究指出,大部份受到 ABA 調節而表現的基因序列具 有保守性的 ABA-responsive elements (ABREs; PyACGTGG/TC),其上的 ACGT 是能被一類稱作 basic leucine zipper (bZIP) 的轉譯調控因子家族所辨認且加以結 合的序列。一般而言,DNA 上單一段 ABRE 序列無法達成 ABA 誘導作用,通

常需要數個 ABREs 或有其他 coupling elements (CEs) 共同存在於轉錄起始處附近。

眾多轉錄調控因子中,bZIP 類轉譯調控因子家族 Group A 的 13 個成員有 9 個 被指出與 ABA 訊息傳遞有關,且能與 DNA 序列上 ABREs 作用。由蛋白質親緣 關係分析可進一步細分為 ABI5/AtDPBF 家族及 AREB/ABF 家族。

ABI5/AtDPBF 家族有 ABI5、EEL、DPBF2/AZIP67、DPBF4、AREB3 等 5 個成 員,主要被表現於種子,被認為調控種子成熟的過程 (Finkelstein and Lynch, 2000a; Bensmihen *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002; Bensmihen *et al.*, 2005); ABI5/AtDPBF 家族 則有 AREB1/ABF2、AREB2/ABF4、ABF1、ABF3 等 4 個成員,主要在 ABA 處 理、鹽份逆境或乾燥逆境下被表現於營養器官中 (Uno *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002; Fujita *et al.*, 2005)。

而研究指出 SnRK2.6/open stomata 1 (OST1) 可磷酸化轉錄調控因子 ABA insensitive 5 (ABI5) (Nakashima *et al.*, 2009)及 ABA-responsive element-binding factor 2 (ABF2) (Fujii *et al.*, 2009),活化其作用於 ABREs 的能力而促近下游 ABA-responsive 基因的表現。

然而,除ABI5/AtDPBF 家族及AREB/ABF 家族外,仍有許多受ABA 誘導而活化的轉錄調控因子,如AP2/ERF、MYB、NAC、HD-Zip、bHLH、C₂H₂-ZF、WRKY等,但並未發現這些轉錄調控因子受SnRK2磷酸化調控,ABA所調控的基因表現可能,經由多種不同的轉錄調控因子或是其他不同的路徑。Nakashima等分析 *snrk2.2/snrk2.6* 三重突變株、*abi3* 突變株和 *abi5* 突變株在ABA 處理DNA 微陣列的mRNA 表現資料,發現受到影響的基因表現並非完全相符,而呈部份重疊的調控網絡,顯示不同下游調控路徑的存在(Nakashima *et al.*, 2009)。

19



Figure 1-5. Network of transcriptional regulation by ABA via ABI5 and AREBs. Adapted from (Fujita *et al.*, 2011).

1.1.2.3. SnRK2 所調控之膜蛋白質

目前已有研究指出 SnRK2.6/OST1 藉由磷酸化作用,對離子通道如 slow anion channel-associated 1 (SLAC1) (Geiger *et al.*, 2009) 及 inward-rectifying K⁺ channel in *Arabidopsis thaliana 1* (KAT1) (Sato *et al.*, 2009),以及在胞內產生過氧化氫的膜蛋 白 respiratory burst oxidase homolog F/D (RbohF/D) (Sirichandra *et al.*, 2009)等進行 活性調控,直接或間接影響氣孔關閉行為。

為何長時間演化下,阿拉伯芥基因組會有如此多 ABA 訊息傳遞相關的參與者, 彼此是否有基因冗餘的狀況,藉由分析其突變株之 ABA 反應、基因表現的組織、 時間、蛋白質的細胞內定位、交互作用蛋白質及表現的消長關係,或許能進一步 瞭解這些同源蛋白質作用的機制與調控的生理反應。



Figure 1-6. Integrated network of ABA biosynthesis, signaling and the protein interactions in *Arabidopsis thaliana*

Arrow ends are for promotion; blunt ends are for inhibition; dotted lines are for proposed mechanisms; solid lines are for validated mechanisms (Hauser *et al.*, 2011).

1.1.3. 氟孔行為調控

在植物葉表皮有許多由成對保衛細胞所構成的氣孔結構,氣孔相當於植物體的 對外門戶,為氣體交換及蒸散作用的孔道,但也是病原菌入侵植物體的主要管道。 因此氣孔開闔行為在不同環境下都別具生理意義。

研究指出,除 ABA,受傷、病菌感知、缺水、臭氧、光照等直接或間接產生的 環境因子都會影響氣孔開闔。由於成對保衛細胞相對的一側細胞壁較厚實,在細 胞充滿水時膨壓作用使氣孔結構張大,而缺水時會使氣孔開口縮小。簡言之,氣 孔開闔行為的直接成因在於保衛細胞的滲透壓高低,改變水份進出細胞的趨勢而 影響膨壓,造成氣孔開口增大或縮小,因此調控關鍵在於保衛細胞的離子通道, 目前 ABA 訊息傳遞造成的蛋白質磷酸化,已被指出直接影響離子通透性,但影響 各離子通道作用的機制尚未明朗。

1.1.3.1.離子通道及其調控

保衛細胞的重要離子通道有 KAT1、KAT2、AHA1/OST2 (Arabidopsis H⁺ ATPase1/open stomata 2)、SLAC1、SLAH3 (SLAC1 homolog 3)、GORK1 (gated outwardly-rectifying K⁺ channel) 等。

在藍光照射下,保衛細胞膜上的陰離子通道被去活化,且活化 AHA1/OST2 向 胞外輸出氫離子的作用 (Marten *et al.*, 2007),造成膜兩側電位差改變而使 KAT1、 KAT2 開啟,向胞內運輸鉀離子,使胞內滲透壓增加,水份進入保衛細胞而使氣孔 開口增大。氣孔關閉時,KAT1、KAT2 及 AHA1/OST2 關閉,鉀離子流入及氫離 子流出量減少,而 SLAC1 及 SLAH3 等陰離子通道開啟,陰離子如氯離子、磷酸 根離子流出細胞,GORK1 亦開啟使鉀離子流出細胞,整體的作用使離子及水份流 出細胞,導致氣孔開口縮小。

鈣離子也在氣孔關閉行為中具有重要角色,胞外較高濃度的鈣離子能促使細胞 質內鈣離子濃度上升而造成氣孔關閉,其作用可能藉由 calcium-dependent protein

22

kinase (CDPK) 進行,2000 年研究發現 H₂O₂ 的處理能使胞内鈣離子濃度上升 (Pei *et al.*, 2000),而 AtrbohF/D 功能缺失的植株在 ABA 處理無法提升胞內鈣離子濃度,也無法使氣孔正常地關閉 (Kwak *et al.*, 2003a)。2009 年也有研究指出胞外的鈣離子能促進保衛細胞內 NO 的累積,進而導致氣孔關閉 (Li *et al.*, 2009),顯示 ABA 造成的氣孔關閉,在 ABA 下游仍有其他的訊息分子如 H₂O₂ 和 NO 等。



Figure 1-7. The important ion channels and proteins involved in stomatal behavior White broad arrows indicate the change in protein activity, while the targets of black narrow arrows indicate the proteins regulated. Abbreviations: KAT1/2, potassium channel in *Arabidopsis thaliana* 1/2) ; AHA1/OST2, *Arabidopsis* H⁺ ATPase1/open stomata 2; SLAC1, slow anion channel associated 1; SLAH3, SLAC1 homolog 3; GORK1, gated outwardly-rectifying K⁺ channel; CDPK, calcium-dependent protein kinase; SnRK2, Snf1-related protein kinase2; PP2C, protein phosphatase 2C; PYR, pyrabactin resistance (Joshi-Saha *et al.*, 2011b).

1.1.3.2.造成氣孔關閉的訊息分子

目前已知 ABA、乙烯及水楊酸 (salicylic acid, SA) 都能導致氣孔關閉,其下游

涉及的共同訊息分子有 H₂O₂ 及 NO。藉螢光染劑 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) 偵測 H₂O₂,或由 diaminofluorescein diacetate (DAF-2 DA) 偵測 NO 生成,可發現 ABA 及乙烯處理皆造成保衛細胞中 H₂O₂ 及 NO 的生成 (Bright *et al.*, 2006),ABA 及乙烯處理造成氣孔開口縮小,已被指出是藉由 AtrbohF 生成 H₂O₂而傳遞訊息 (Desikan *et al.*, 2006)。而 H₂O₂、ABA、SA 等能造成氣孔 開口縮小的訊息分子也被指出能誘使保衛細胞產生 NO,可知 ABA、SA 及乙烯 在氣孔關閉訊息傳遞中位於 H₂O₂及 NO 之上游,而 H₂O₂又位於 NO 上游。相關 實驗亦指出,直接對植物下表皮進行 H₂O₂或 *in vitro* NO 提供者亞硝基氰化鈉 (sodium nitroprusside, SNP) 處理,可導致氣孔開口縮小,足可說明 H₂O₂和 NO 在 氣孔關閉行為中的重要地位(Bright *et al.*, 2006)。

NO 的 *in vitro* 處理主要以 SNP 水溶液進行之,但 SNP 被認為除釋放 NO 分子 之外,其中錯合的氰離子 (CN⁻) 亦有機會游離出,而釋放 NO 後殘留的鐵氰錯離 子也可能因氧化還原反應發生變化產生 $[Fe(CN)_6]^3 \cdot [Fe(CN)_6]^4$ 等,對此,Bright 等及 Hao 等以 CN⁻、 $[Fe(CN)_6]^3 \cdot [Fe(CN)_6]^4$ 及失活的 SNP 等進行氣孔行為實驗, 排除 SNP 中 NO 之外的離子及錯合物引發氣孔關閉的可能性 (Bright *et al.*, 2006; Hao *et al.*, 2010) 。

1.1.3.3. 離層酸引起的氣孔關閉

由 ABA 引起的氣孔開口縮小現象,目前認為可經由 SnRK2.6/OST1 的活化, 而 OST1 活化 AtRbohD/F 產生 H₂O₂,進而引發胞外鈣離子進入及下游訊息分子 NO 生成,OST1 亦以磷酸化方式關閉下游離子通道 KAT1 及 KAT2,並開啟 SLAC1 以達成之。

若干擾 H_2O_2 和 NO 生成,例如以 catalase 或 ascorbic acid 處理表皮,以分解 或還原 H_2O_2 ,將抑制氣孔在 ABA 處理的關閉行為,而受 ABA 調控生成 H_2O_2 的 酵素 AtroohD/F 功能缺失的植株,氣孔也無法在 ABA 處理關閉 (Bright *et al.*, 2006)。阿拉伯芥及蠶豆材料的研究都指出,在 ABA 處理後,能以螢光染劑分子

DAF-2 DA 偵測到保衛細胞內 NO 生成,反之若以去除 NO 之藥劑 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (PTIO) 與 ABA 共同處理下 表皮,則會干擾氣孔因 ABA 處理開口縮小的現象 (Lu *et al.*, 2005; Bright *et al.*, 2006);另一方面,無法正常產生 NO 分子的阿拉伯芥突變株 *nia1/nia2* (nitrate reductase1/2) SA 處理造成之氣孔開口縮小行為亦不如野生株,對其進行 SNP 處理 則能使氣孔縮小 (Hao *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2010),顯示 NO 確實參與 ABA 及 SA 造成的氣孔關閉。



OST1, open stomata 1; NOS, nitric oxide synthase (AT3G47450, now renamed as nitric oxide associated, NOA, for no nitric oxide synthase activity observed) ; NR, nitrite reductase; OXI1, oxidative signal-inducible 1; GSH, reduced glutathione; GSNO, nitrosylated glutathione; MAPK, mitogen-activated protein kinase; ROS,

reactive oxygen species; cGMP, cyclic cyclic guanosine monophosphate; OONO-, peroxynitrite (Neill *et al.*, 2008).

Desikan 等發現 ABA—H₂O₂—NO 使氣孔關閉的上下游關係後,偵測保衛細胞 中 H₂O₂或 NO 的生成,及對保衛細胞進行 H₂O₂或 SNP 處理,開始成為氣孔行 為研究的新趨勢,然而,目前對於這兩種活性分子造成氣孔開口縮小的機制,乃 至於其作用的蛋白質目標,仍所知有限。對於氣孔開闔相關訊息傳遞路徑上的突 變株進行 H₂O₂或 SNP 處理,並分析其氣孔行為,或許能瞭解中各蛋白質的作用 機制,以及之間的上下游關係。

1.1.3.4. 氣孔開啟行為

一般認為光照能促使氣孔開啟,Kinoshita 及 Shimazaki 在蠶豆保衛細胞的研究 中發現,藍光照射後 H⁺-ATPase 的 C 端能被磷酸化,並與一 14-3-3 蛋白質結合, 水解 ATP 以將 H⁺ 送出胞外,改變電位的結果則使得 KAT1 及 KAT2 開啟,鉀離 子流入胞內而使氣孔開啟 (Kinoshita and Shimazaki, 1999);Marten 等也指出藍光照 射能抑制保衛細胞膜上陰離子通道之通透性 (Marten *et al.*, 2007)。在 2012 年, Zhao 等發現訊息分子 NO 的作用會抑制藍光照射下氣孔開啟的行為 (Zhao *et al.*, 2012),與在光照處理氣孔仍受關閉訊息分子作用的現象一致,顯示對於氣孔而言, 光照與氣孔關閉因子同時存在時,使氣孔關閉訊息優先於光照造成的開啟訊息。

1.1.4. 離層酸調控主根生長

植物根系的發育也受到 ABA 調控,具體機制目前尚無定論。Ephritikhine 等發 現野生株幼苗在低濃度外源 ABA (< 1 μM) 的環境下可促進主根的生長達 10% 左右,超過此濃度則會發生抑制主根生長的作用 (Ephritikhine *et al.*, 1999)。ABA 訊息傳遞部份缺失的突變株 *snrk2.3* 幼苗主根,在 3~50 μM ABA 處理生長程度皆 顯著大於野生株幼苗,然而 *snrk2.2* 幼苗在相同處理主根生長的程度則與野生株幼 苗相當,顯示 ABA 對於主根的生長抑制確實需要 SnRK2 參與,而眾多 SnRK2 成員可能具有不同功能及作用 (Fujii *et al.*, 2007)。而 Kwak 等研究 AtroohD 及 AtrbohF 在 ABA 訊息傳遞中的參與情形,發現兩個基因皆缺失的植株在 ABA 造成的氣孔關閉行為,以及 ABA 造成的主根生長抑制均較不敏感;而使用 H₂O₂ 處理突變株的保衛細胞及幼苗,都能回復對於 ABA 不敏感的現象,顯示 H₂O₂ 參與 氣孔行為與主根生長抑制的調控 (Kwak *et al.*, 2003b)。

1.2. HHP 蛋白質家族與 HHP1

在阿拉伯芥基因體定序完成後,經序列比對分析,發現其中有 5 個與動物 progesterone receptor 序列接近的蛋白質,由於被預測具有 7 個穿膜區,而將其命 名為 heptahelical protein (HHP),分別為 At5g20270 (HHP1)、At4g30850 (HHP2)、 At2g24150 (HHP3)、At4g37680 (HHP4) 及 At4g38320 (HHP5) (Hsieh and Goodman, 2005)。

序列比對結果顯示,這些蛋白質的胺基酸序列與人類 adiponectin receptor 1 (HsAdipoR1) 的相似度從 34.6% 至 38.2%不等,而與 HsAdipoR2 的相似度從 31.4% 至 36.1%不等;且與人類 membrane progestin receptors alpha, beta, gamma (HsMPRA, HsMPRB, HsMPRG) 的相似度亦達四分之一左右(Hsieh and Goodman, 2005)。

HHP1 蛋白質經胺基酸序列分析,被預測具有 7 個穿膜區塊,應是位於細胞膜上的膜蛋白,其 N 端指向胞内而 C 端指向胞外 (Hsieh and Goodman, 2005),然而目前仍有待細胞内定位實驗確認其所在之構造,以及實驗確認其兩端之指向。

1.2.1. 表現 HHP1 之組織與誘導表現的因子

HHP1 promoter::GUS 的研究指出 GUS 活性出現在輸導組織、保衛細胞,以及 生殖器官的許多構造中。而隨著花及果莢發育,GUS 活性也隨之有不同的消長情 形。以 real-time PCR 方式發現,阿拉伯芥幼苗在 ABA 及 NaCl 處理 HHP1 mRNA

表現量會顯著上升,分別達 6 倍及 12 倍左右,然而冷處理造成的 HHP1 mRNA 表現只出現在處理開始的 2 小時間,其後反而呈下降趨勢。

經由 HHP1 promoter::GUS 分析,也發現其阿拉伯芥幼苗在 ABA 及 NaCl 處理會活化 HHP1 promoter,顯示 HHP1 可能與 ABA 做用或滲透壓調節有關 (Chen *et al.*, 2009, 2010)。

以 Genevestigator (www.genevestigator.com) (Hruz et al., 2008) 分析 DNA 微陣 列資料庫的資料,確可觀察到 HHP1 mRNA 的表現量受到 ABA 誘導,野生株植 株的幼苗或懸浮培養細胞,在 ABA 處理 HHP1 mRNA 表現量皆上升,從處理 1 小時上升 2.28 倍,至處理 20 小時上升 54.5 倍之情形,顯示出 HHP1 確實受到 ABA 誘導;而已知會影響種子 ABA 訊息傳遞之 ahg1-1 及 ahg3-1 種子在 ABA 處理 HHP1 mRNA 表現量下降至未處理者之 1/2.6 左右,而野生株種子下降至 1/1.69 倍;ABA 訊息傳遞部份缺失的 SnRK2.8/SnRK2.7 雙重突變株 srk2cf,因 ABA 處理造成 HHP1 mRNA 表現量上升 2.37 倍,而野生株在處理後上升 1.90 倍;在 PP2C 部份缺失的突變株 ahg1-1、ahg3-1 及 SnRK2 部份缺失的 srkfc 中,卻未發 現 HHP1 mRNA 表現量在 ABA 處理與野生株有顯著差異。從以上發現可推測 HHP1 mRNA 表現雖然受到 ABA 誘導,但確切的上游調控因子仍有待進一步探 討。

利用 Genevestigator 分析,也發現 *HHP1* mRNA 表現受到 brassinolide (BL) 抑制。以 BL 處理 2 至 10 小時不等,*HHP1* mRNA 表現量皆較未處理者下降,可降至未處理樣本之 1/2.57 至 1/9.97 倍,是各生長調節因子中抑制性最明顯者,推測此一現象可能與 HHP1 參與受 BL 抑制之生理現象有關。

1.2.2. HHP1 對離層酸及冷逆境訊息傳遞的影響

藉由 real-time PCR 研究 ABA 及 NaCl 處理, HHP1 的突變株 hhp1-1 對 ABA-responsive genes 如 KIN1、RD29A、RD29B、COR15A、ADH1、COR47 (Narusaka et al., 2003; Shinozaki et al., 2003)等表現量的影響,發現這群基因除 RD29B 在 NaCl 處理表現量低於野生株外, hhp1-1 中上述六個基因的 mRNA 表現量皆高於 野生株的植株,但 hhp1-1 之互補轉殖株 c-hhp1-1 在相同處理,上述六基因的 mRNA 表現量都與野生株植株相當 (Chen et al., 2009)。已知會被 ABA 訊息傳遞所 活化的轉錄調節因子 ABI3 及 ABI5,也被發現在 ABA 及 NaCl 處理, hhp1-1 中 ABI5 的 mRNA 表現量明顯高於 野生株 及 c-hhp1-1;而 hhp1-1 中 ABI3 的 mRNA 表現量,只被發現在 NaCl 處理明顯高於野生株及 c-hhp1-1, ABA 處理則為與野生 株相當的表現量 (Chen et al., 2009)。ABA 生合成相關的基因如 NCED3、AAO3、 ABA3 等,在 ABA 及 NaCl 處理, hhp1-1 中 mRNA 表現量皆明顯高於野生株 及 c-hhp1-1。由於在 ABA 及 NaCl 處理,前述 ABA-responsive genes 及 ABA 生 合成相關的基因表現在 hhp1-1 中都有增加的現象,因此推測 HHP1 可能在 ABA 的反應及生合成的上游進行負向調控 (Chen et al., 2009)。

而在 16 小時 0 至 4℃ 冷處理,許多 cold-responsive 基因如 *MYB15、CBF1、 CBF2、CBF3、RD29A、KIN1、COR15A、COR47*之 mRNA 皆被誘導表現,然在 *hhp1-1* 突變株中 *RD29A、KIN1、COR15A、COR47、MYB15*及 *CBF3*等的 mRNA 表現卻明顯小於野生株之表現量 (Chen *et al.*, 2010)。比較 ABA 處理及冷處理受 到 HHP1 缺失影響的基因表現,可發現中重複者有 *KIN1、RD29A、COR47*等, 但為何 HHP1 缺失分別造成促進及抑制兩種不同的調控,目前仍然未知。

1.2.3. HHP1 與離層酸相關之生理反應

研究一基因參與 ABA 訊息調控的方式,通常藉比較突變株 ABA-responsive 基因的表現及對於 ABA 造成生理現象之反應,以瞭解基因在其中的參與情形。 ABA-responsive 基因的表現分析已在 1.2.2. 中敘述;生理反應方面,廣為用於 ABA 反應性狀研究者主要有氣孔行為、種子萌發抑制及主根生長抑制等實驗。本 實驗室陳勁中博士等已發現 *hhp1-1* 突變株在 ABA 處理種子萌發率顯著低於野 生株的種子 (Figure 1-9),而呈對 ABA 較敏感的性狀;而 *hhp1-1* 突變株在 ABA 處理的氣孔寬長比,顯著大於野生株的氣孔,顯示出 HHP1 缺失的植株之保衛細 胞對於 ABA 反應較不敏感 (Figure 1-10) (Chen et al., 2009)。



Figure 1-9. Seed germination rates of WT, *hhp1-1*, and *c-hhp1-1*under ABA treatment

(A) Germination rates on the 4th day at different ABA concentration (0, 0.5, 1, or 3 μ M (B) Germination rates at 1 μ M ABA from day 0 to day 7th (Chen *et al.*, 2009).



Figure 1-10. Stomatal width/height ratio of WT, *hhp1-1*, and c-*hhp1-1*under ABA treatment.

Detached fresh leaves of similar size and age from 21-day-old soil-grown WT, *hhp1-1*, and c-*hhp1-1* plants under long-day conditions were floated on stomatal

opening solution for 2.5 hours, then were treated with 0, 1, 10, 100 μ M ABA for another 2.5 hours. The stomatal width/height ratio was then measured. The values are the mean width/height ratio ± SEM for three independent experiments, with approximately 20 to 30 stomata per experiment. The asterisks indicate the level of significance of differences between the WT and hhp1-1 or c-hhp1-1 plants under the same treatment. (*P <0.05; **P <0.01, using Student's t test) (Chen *et al.*, 2010).

至於在 ABA 處理植株的根部發育,在陳勁中博士的初步實驗中發現,以含 3% (w/v) 蔗糖的培養基中添加不同濃度 ABA 進行處理,野生株與 HHP1 缺失的植株 並無顯著差異 (未發表資料)。然而有研究指出培養基中的蔗糖會影響 ABA 的訊 息傳遞 (Finkelstein and Lynch, 2000b),而 HHP1 亦被表現於側根發育處,遂於本 論文中以不含蔗糖的培養基進行實驗,以試圖瞭解 HHP1 在根部發育及 ABA 調 控中的可能角色。

1.3. 研究方向

由於 HHP1 基因表現受到 ABA 的誘導,而缺失 HHP1 的突變株 hhp1-1 在 ABA 處理的生理反應,如種子萌發率及氣孔反應皆呈現不同於野生株的結果,顯 示 HHP1 參與 ABA 相關的訊息調控。

然而 ABA 調控多種生理反應,在比較 HHP1 被表現的構造之後,決定優先探 討其被表現之組織相關的 ABA 反應,例如氣孔以及根部進行 ABA 或其下游訊 息傳遞物處理,以找出 HHP1 調控 ABA 訊息傳遞中的層次,以及在不同組織中 的調控行為。

實驗分為兩大方向:其一是藉由對下表皮進行 ABA 及其下游訊息分子 H₂O₂、 NO 處理,比較突變株對處理的反應;其二則比較 ABA 處理的主根發育,以試 圖瞭解 HHP1 在 ABA 造成氣孔關閉訊息傳遞中可能的作用層面,以及 HHP1 是 否參與 ABA 抑制主根生長的生理作用。

第二章 材料與方法

2.1. 植物材料

2.1.1. 阿拉伯芥 Arabidopsis thaliana

阿拉伯芥,學名 Arabidopsis thaliana。為雙子葉十字花科一年生草本植物,由於 生長期短且容易栽培,又因僅具一套五對染色體,轉植株建構、基因定位及同型 合子篩選技術相當成熟,被廣泛應用為研究之模式植物。

本實驗中使用之阿拉伯芥野生株哥倫比亞品種(Col-0),及其 HHP1 基因之 T-DNA 插入突變株(hhp1-1, SALK_056174),野生株及 hhp1-1 之種子均購自 The Arabidopsis Information Resource (TAIR)。突變株經數代栽種,並抽取子代之 genomic DNA 以檢驗用引子進行聚合酶鏈鎖反應(polymerase chain reaction, PCR), 挑選出為兩條同源染色體上皆有 T-DNA 插入之同型合子,而無法正常表現 HHP1 的植株,以其子代進行實驗。

2.1.2. HHP1 基因互補之植株— c-hhp1-1

陳勁中博士以黏性端聚合酶鏈鎖反應 (sticky-end PCR),自野生株哥倫比亞品種 之 cDNA 製備 5'端及 3'端具有限制酶切位的 *HHP1* coding sequence 片段,以 ligase 作用接入農桿菌轉型用之 binary vector pCAMBIA 1302,再以電穿孔轉型方 式,使農桿菌 GV3101 帶有 pCAMBIA 1302-HHP1 載體,篩選及檢驗後以成功 轉型的農桿菌菌液進行花序沾染法 (Bent, 2000),將載體轉型至同型合子之 *hhp1-1* 植株。農桿菌的 DNA 插入機制有機會將 pCAMBIA 1302 序列中 Left T-Boarder 及 Right T-Boarder 間的 DNA 片段 (T-DNA) 插入阿拉伯芥胚珠的基因套組,進 而發育成種子而得到基因插入的轉殖株 complementary *hhp1-1* (c-*hhp1-1*)。

經農桿菌成功轉型 pCAMBIA 1302 的轉殖株將會帶有 hygromycin 抗性,且能
以 CaMV 35S 啟動子表現 HHP1 coding sequence,轉譯成不具其他胺基酸標記的 HHP1 蛋白質,經 real-time PCR 檢驗,在同型合子 complementary hhp1-1 植株 中 HHP1 mRNA 表現量約為野生株表現量之 0.7 倍至 3 倍不等 (陳勁中,博士 論文)。

2.2. 試劑

2.2.1. 離層酸

Abscisic acid,分子量 246.32,使用 HPLC 檢驗純度大於 98.5% (±)-Abscisic acid, 購自 Sigma-Aldrich,分子量仍以 246.32 計。為含有 (+)-(*S*)-ABA 及 (-)-(*R*)-ABA 的混合物,實驗中用以處理阿拉伯芥下表皮及幼苗。

配製母液:由於無足夠小的定量裝置,配製 100 mM 母液時乃是取 X μmole (±)-ABA 後以微量吸量管加入乙醇 10X μL 配成乙醇溶液,分裝至微量離心管後 於 -20℃ 紙盒中避光保存。(外觀應呈無色透明;配製時並非稱取藥品後定量至指 定體積)。

2.2.2. 過氧化氫

Hydrogen peroxide, 化學式 H₂O₂, 無色透明液體, 4℃ 避光保存, 使用時濃度 以 30% (w/v) 計, 經換算為 9.70 M, 實驗中用於測試氣孔關閉行為。

2.2.3. 亞硝基氰化鈉

Sodium nitroprusside dihydrate, SNP, 化學式 Na₂[Fe(CN)₅NO]·2H₂O), 純度大於 98.0%, 式量以 297.95 計, 購自 Sigma-Aldrich。暗紅色不規則狀固體, 新鮮水溶液呈紫紅色,若未避光保存會逐漸轉為墨綠色。在實驗中作為 NO 分子的 *in vitro* 提供者, 在溶液中逐漸釋出 NO。

配製母液:取適量固體以二次水配置成 50 mM 水溶液,分裝至微量離心管後於 紙盒中 -20℃ 避光保存。分裝之母液在解凍後仍應呈紫紅色,解凍後的母液在使 用後捨棄,不再重新冷凍。

2.2.4. Stomatal opening buffer

含 10 mM 2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid (MES), 50 mM KCl, 50 μM CaCl₂, 以 KOH 調整 pH 至 6.15,最後以二次水定量至指定體積 (Kuhn, Boisson-Dernier *et al.* 2006)。

2.3. 阿拉伯芥種植

2.3.1. 培養介質

2.3.1.1. Murashige and Skoog 植物培養基

簡稱 MS medium,使用 Sigma M0404,每公升培養基用 2.2g 配成濃度減半的 1/2 MS medium (1/2 MS),加入 30g 蔗糖,以 NaOH 調整 *p*H 為 5.7 至 5.8, 再加入 8 g phytoagar,微波爐加熱溶解後以量筒測量並加水至預定體積,裝瓶於 121℃ 高溫高壓蒸汽滅菌 20 min,待冷卻至不燙手,倒入培養皿凝固之後方可使 用 (Murashige and Skoog, 1962)。ABA 處理用之固態培養基則不添加蔗糖,以避免 蔗糖干擾 ABA 訊息傳遞 (Finkelstein and Lynch, 2000b),且在冷卻至不燙手後於 無菌操作檯中加入 ABA 乙醇溶液至指定終濃度。

2.3.1.2. 盆栽培養用介質

使用荷蘭土與三號根基旺以體積一比二之比例均勻混合的培養用介質。荷蘭土 購自彰城園藝,而三號根基旺購自丁蘭花盆工程材料行。使用前需將荷蘭土的團 塊捏散,與三號根基旺混合均勻後以高溫高壓蒸汽滅菌後方可使用。

2.3.2. 生長環境

植物生長箱 (FIRSTEK GC102) 及植物生長室,皆設定成 16 小時光照及 8 小時 黑暗的光週期,以植物生長燈為光源自每層架之上方照射,調整光度至 5000 至 7000 lux 之間,溫度設定於 22℃。

2.3.3. 種子表面滅菌處理及發芽同步化

取適量種子於 15 mL 離心管或 1.5 mL 微量離心管中,加入 1mL 75% (v/v) 酒 精潤溼種子表面後去除酒精,再加入消毒液(水:10% (w/v) 次氯酸鈉:Tween-20 = 8:1:0.02) 至三分之二容器體積後振盪清洗 10 min,去除消毒液後加入無菌水至 三分之二容器體積並振盪清洗 1min,無菌水清洗的步驟共重覆 5 次,以去除殘留 消毒液,最後加入少量水使種子易被懸浮而有利於後續同步化操作。

種子發芽的同步化乃將種子於離心管中以水懸浮,於 4℃ 下避光培養 3日,使 種子發芽所需的時間趨於一致。

2.3.4. 種子與幼苗移植

經同步化之種子於無菌操作檯內以無菌水清洗 3 次之後,以無菌水挾帶種子均 勻撒布至 1/2 MS 固態培養基上 (含 3% (w/v) 蔗糖),並吸除培養基上殘水,於無 菌操作檯內風乾至可清楚看到種子與培養基的交界,再以石蠟膜封住培養皿後於 植物生長箱中照光培養。

氣孔行為實驗使用的植株,種子在生長箱中培養至幼苗第一對真葉達 2 mm 寬 後 (約 10 日),移植幼苗至泥炭土與根基旺一比二混合均匀之培養介質中。每個 大盤可容納 12 個直徑 8.8 cm、深 7 cm 之小盆,每個小盆種植 4 株幼苗,澆水 時一次加水 800 mL 於大盤盤底。由於培養介質保水性良好,大盤內水乾後一日 才再加水。而主根生長抑制實驗所用的植株,則在生長箱中培養 5 日後移植至處 理用 1/2 MS 固態培養基。

2.4. 氣孔關閉實驗

2.4.1. 植物下表皮材料

阿拉伯芥植物材料種植如前段所述,實驗中分離下表皮的時間在生長箱的光源 已開啟達兩小時之後。取用的葉片不能枯萎或受傷,且必須來自已充分澆水的植 株,因此在進行取樣一日之前就要先行澆水。

自同步化處理結束四到五週之植株,取長度 2.5~3.5 cm 之蓮座葉於滴加有 stomatal opening buffer 之潔淨玻璃板上進行操作,以一鑷子壓住其主葉脈,同時 以另一鑷子撕破葉片以分離下表皮。

此時,被撕下的破片得以直接漂浮於 stomatal opening buffer 上,不致因暴露在 空氣中而快速乾燥。以手術刀片在 stomatal opening buffer 中切除殘留有葉肉組織 及葉脈的部份後,將下表皮切成長邊達 3 mm 小塊,以利後續操作。

操作時應注意需在充足光照下進行,且避免長時間離開 stomatal opening buffer 以確保下表皮維持在溼潤有光的環境。由於取下表皮、後續操作及製作下表皮顯 微顯微玻片都需要時間,因此從每一樣品取下表皮的時間盡量固定間隔 15 至 20 min,處理及觀察的時間才能趨於一致。

2.4.2. 下表皮處理

將取下之下表皮轉移至裝有 stomatal opening buffer 的小型塑膠培養皿,完全壓 入溶液中使其漂浮。注意勿使附著於器壁、捲曲或沾附氣泡而不能充分接觸緩衝 溶液。必要時以鑷子將下表皮展開,或去除附著其上的氣泡。之後於生長室中光 照 2.5 小時以誘使氣孔開啟 (Bright *et al.* 2006) 。

2.4.2.1. 控制組

光照 2.5 小時誘使氣孔開啟後,控制組於 stomatal opening buffer 中繼續光照 2.5 小時,與少量進行處理用之溶液製成顯微玻片後以顯微鏡 Olympus BX50 進行 觀察,並以與其相連之 Olympus DP70 拍攝相片記錄,最後以影像軟體 ImageJ1.45s 測量其氣孔開口大小。

2.4.2.2. 避光處理

誘使氣孔開啟後,取出下表皮至另一含有 stomatal opening buffer 的小型塑膠培 養皿中,以鋁箔紙妥善包覆避光,再於生長室培養 2.5 小時。其後取出下表皮, 與少量進行處理用之溶液製成顯微玻片,拍攝及記錄同 2.4.2.1。

2.4.2.3. ABA 處理

進行藥劑處理實驗時,為使 stomatal opening buffer 中處理藥劑濃度均一,先以 藥品母液及 stomatal opening buffer 配製 50 mL 溶液至 0、1、10 μM ABA 後再 分裝至各培養皿,處理濃度參考自 Bright 等發表之文獻 (Bright *et al.*, 2006)。所 用藥品母液為 100 mM ABA 乙醇溶液 (-20℃ 避光保存,參見 2.2. 試劑)。誘使 氣孔開啟之後,取出下表皮至含有處理藥劑之 stomatal opening buffer 中,再於生 長室照光 2.5 小時後取出下表皮,與少量進行處理用之溶液製作顯微顯微玻片, 拍攝及記錄同 2.4.2.1。

2.4.2.4. H₂O₂ 處理

進行藥劑處理實驗時,為使 stomatal opening buffer 中所含處理藥劑濃度均一, 先以 30% (w/v) H₂O₂ 水溶液 (莫耳濃度以 9.70 M 計)及 stomatal opening buffer 配製 50 mL 溶液至 100 µM H₂O₂ 後再分裝至各培養皿 (Bright *et al.* 2006)。所用 藥品母液為 30% (w/v) H₂O₂ 水溶液 (4℃ 避光保存,參見 2.2. 試劑)。誘使氣孔 開啟之後,取出下表皮至含有處理藥劑之 stomatal opening buffer 中,再於生長室 照光 2.5 小時後取出下表皮,製作顯微玻片、拍攝及記錄方法同 2.4.2.3。

2.4.2.5. SNP 處理

進行藥劑處理實驗時,為使 stomatal opening buffer 中所含處理藥劑濃度均一, 先以 SNP 水溶液配製 50 mL 溶液至 50 µM SNP 後再分裝至各培養皿 (Bright *et al.* 2006)。所用藥品母液為 SNP 水溶液 (-20℃ 避光保存,用畢不重覆冷凍,參 見 2.2. 試劑)。誘使氣孔開啟之後,取出下表皮至含有處理藥劑之 stomatal opening buffer 中,再於生長室照光 2.5 小時後取出下表皮,製作顯微玻片、拍攝及記錄方 法同 2.4.2.3。

2.4.3. 氟孔開口測量

由發育中的保衛細胞所形成的氣孔,孔徑較小而形狀接近正圓,不如成熟保衛 細胞所呈現的狹長橢圓形氣孔,且尚不會因 ABA 處理或缺乏光照而使開口變小, 故在測量時只測量構造完整,且已發育成狹長橢圓形的氣孔。拍攝時盡量避免視 野的重疊以降低重覆取樣。視野下的氣孔除破損、過小、不成熟或嚴重失焦者, 都進行開口寬度測量,每一處理測量 60 個氣孔的開口寬度。

在不同對焦深度下,氣孔構造雖未改變,由於焦平面通過各氣孔的位置有所不同,呈現出的細節是不同的。因此,對下表皮的同一區域拍攝數張不同對焦深度的相片,歸納出以下不同對焦位置下可共通的測量基準。

顯微鏡下可觀察到氣孔周圍的構造,最外圍是一層透明的亮圈,往內可觀察到 呈淡藍綠色的亮圈,再往內可觀察到呈深紅棕色的暗圈。測量時以暗圈的內緣與 其他構造的交界處為邊,與氣孔開口長軸垂直的方向測量氣孔最寬處兩側的距 離。

2.5. 離層酸主根生長抑制實驗

阿拉伯芥種子經表面滅菌處理及發芽同步化後,撒播於 1/2 MS 固態培養基 (含 3% w/v 蔗糖及 0.8% (w/v) phytoagar),於植物生長箱中培養五日。取大小及根長相

38

近之植株移植至 ABA 處理用之 1/2 MS 固態培養基 (使用方形培養皿,培養基中含 0, 3, 10 μM ABA 及 0.8% (w/v) phytoagar,不含蔗糖),每一培養皿 (9×9× 1.5 cm) 平均種植六株幼苗,不同品系之幼苗以固定的排列順序種植於同一培養皿 中以降低培養皿間差異造成的干擾,不同濃度 ABA 的培養基各種植十盤。

固定距離拍照記錄初始主根長度,再於生長箱中直立培養六日,以相同距離拍 照,並以影像分析軟體 ImageJ 1.45s 測量主根長度,將兩日測得的主根長度相減 得到生長長度。由於移植過程中可能造成植株或生長點受損,而使植株出現生長 遲滯狀況,因而不論是否發生生長遲滯,皆從每一品系及處理測得的 10 個主根 生長中剔除最小的 3 個數據,之後以餘下的 7 個進行統計與分析。

2.6. 實驗結果統計與分析

相同處理的氣孔行為實驗使用單因子變異數分析 (one-way ANOVA) 以及 Fisher's Least Significance Difference (LSD) 進行分析。先以 one-way ANOVA 鑑定 相同處理的三種品系 (WT、*hhp1-1*、*c-hhp1-1*) 測得的氣孔寬度值是否有任兩種品 系不相同 (以 $\alpha = 0.05$ 為分界),若有,則進一步以 Fisher's LSD 鑑別品系間氣 孔寬度值之異同 (以 $\alpha = 0.05$ 為分界)。

控制組及實驗組的氣孔寬度測值則使用 *Student*'s t-test 檢定,得到 p 值小於 0.05 之組別才判定其間在統計上有顯著差異。

第三章 結果與討論

3.1. 氣孔行為實驗

3.1.1. 光照下 hhp1-1 氣孔寬度大於野生株

阿拉伯芥下表皮在 stomatal opening buffer 之中照光處理 5 小時之後,三次獨立 實驗中,野生株氣孔平均寬度的觀測值依序為 $3.77 \pm 0.30 \,\mu$ m、 $3.47 \pm 0.31 \,\mu$ m、 $3.62 \pm 0.49 \,\mu$ m,而 *hhp1-1* 氣孔的平均寬度則依序為 $4.40 \pm 0.94 \,\mu$ m, $3.92 \pm 0.57 \,\mu$ m、 $4.79 \pm 0.68 \,\mu$ m (Figure 5-1),以 LSD 法進行檢驗,三次的結果皆呈現突變 株 *hhp1-1* 在照光處理後,氣孔開口寬度顯著大於野生株氣孔 (p < 0.05),而寬度 較野生株多出 13% 至 32% 不等。

3.1.2. 黑暗中 hhp1-1 氣孔寬度大於野生株氣孔

阿拉伯芥下表皮在 stomatal opening buffer 之中照光處理 2.5 小時接續避光處理 2.5 小時後,三次獨立實驗中,野生株氣孔平均寬度的觀測值依序為 2.37 ± 0.24 μ m、2.44 ± 0.40 μ m、1.97 ± 0.18 μ m,而 *hhp1-1* 的平均寬度為 3.29 ± 0.70 μ m、2.83 ± 0.46 μ m、2.18 ± 0.28 μ m (Figure 5-3,圖中僅呈現一次實驗的結果)。以 LSD 法進行檢驗,呈現突變株 *hhp1-1* 在處理之後,氣孔開口寬度顯著大於野生株氣孔 (p < 0.05),較野生株多出 11% 至 39% 不等。

3.1.3. H₂O₂ 處理 hhp1-1 氣孔寬度與野生株氣孔相近

阿拉伯芥下表皮在 stomatal opening buffer 之中照光處理 2.5 小時接續 H_2O_2 處 理 2.5 小時後,三次獨立實驗中,野生株氣孔平均寬度的觀測值依序為 2.65 ± 0.54 μ m、2.29 ± 0.28 μ m、2.70 ± 0.20 μ m,而 *hhp1-1* 平均寬度為 2.76 ± 0.41 μ m、 2.68 ± 0.37 μ m、2.70 ± 0.32 μ m (Figure 5-5,圖中僅呈現一次實驗的結果)。以 LSD 法進行檢驗,第一次及第三次獨立實驗的結果呈現突變株 hhp1-1 在處理之後,氣 孔開口寬度與野生株無顯著差異 (p < 0.05),而第二次實驗結果呈現突變株 hhp1-1 在處理之後,氣孔開口寬度顯著大於野生株的現象 (p < 0.05)。由於實驗結果不穩 定,僅推測 H_2O_2 處理 hhp1-1 氣孔寬度可能與野生株株相近。

3.1.4. SNP 處理 hhp1-1 氣孔寬度與野生株植株氣孔相

近

阿拉伯芥下表皮在 stomatal opening buffer 之中照光處理 2.5 小時接續 SNP 處 理 2.5 小時後,三次獨立實驗中,野生株氣孔平均寬度的觀測值依序為 2.93 ± 0.39 µm、2.93 ± 0.33 µm、2.63 ± 0.39 µm,而 *hhp1-1* 的平均寬度為 3.12 ± 0.47 µm、3.10 ± 0.57 µm、3.24 ± 0.48 µm (Figure 5-7,圖中僅呈現一次實驗的結果)。 以 LSD 法進行檢驗,第一次及第二次獨立實驗的結果呈現突變株 *hhp1-1* 在處理 之後,氣孔開口寬度與野生株無顯著差異 (p < 0.05),而第三次的實驗結果呈現突 變株 *hhp1-1* 在處理之後,氣孔開口寬度顯著大於野生株的現象 (p < 0.05)。由於 實驗結果不穩定,僅推測 SNP 處理 *hhp1-1* 氣孔寬度可能與野生株植株相近。

3.1.5. ABA 處理 hhp1-1 氣孔反應可能與野生株氣孔 相近

從 Figure 5-9 中可發現,1 μM 及 10 μM 的 ABA 處理確實造成野生株、hhp1-1 及 c-hhp1-1 的氣孔寬度顯著縮小。然而縮小程度隨 ABA 濃度增加的 dose-dependent 現象並不顯著,(A) 的結果中,三種品系在1 μM 及 10 μM 的 ABA 處理並無顯著的差異;(B) 結果中則出現 10 μM ABA 處理氣孔平均寬度大於1 μM ABA 處理的平均寬度,在 (C) 亦有如此結果。顯示所使用的 ABA 本身確實具有 生理活性,但三次實驗的操作並不穩定。

41

在三次 ABA 處理實驗中,1 μM ABA 處理 *hhp1-1* 的氣孔寬度,與野生株氣孔 寬度相比,依先後順序分別是顯著大於 (*p* < 0.01)、差異未達 5% 顯著水準及顯著 小於 (*p* < 0.01);而在 10 μM 的 ABA 處理 *hhp1-1* 的氣孔寬度,與野生株氣孔寬度 相比,則分別是顯著大於 (*p* < 0.01)、顯著大於 (*p* < 0.01) 及差異未達 5% 顯著水 準。若以 0 μM 處理結果定為 100% 對其他處理進行標準化,處理下氣孔可縮小 至未處理者的 60 至 80% 之間。1 μM ABA 處理 *hhp1-1* 的氣孔寬度與野生株氣 孔寬度相比,第一次及第二次結果,兩者差異未達 5% 顯著水準,而第三次結果 則為顯著小於 (*p* < 0.01);而在 10 μM 的 ABA 處理 *hhp1-1* 的氣孔寬度,與野生株 氣孔寬度相比,三次結果則分別是差異未達 5% 顯著水準、顯著大於 (*p* < 0.01) 及 顯著大於 (*p* < 0.01)。若比例上無顯著的差異,則應有相當的敏感程度;比例顯著 較小者,則應為較敏感的品系。

综合以上,本實驗所用的三種品系,其保衛細胞皆能對 ABA 處理有所反應,討 論處理造成的氣孔寬度變化比例,1 μM 處理下 *hhp1-1* 可能與野生株有相當的敏 感程度,而 10 μM ABA 處理三次結果的敏感度趨勢並不相同,因此目前尚無法比 較突變株保衛細胞對於 ABA 的敏感程度。

3.1.6. hhp1-1 與野生株在氣孔行為的差異

光照及避光處理之 *hhp1-1* 氣孔寬度較野生株多出 11% 至 39% 不等,顯示在 未以 ABA 或其下游訊息傳遞分子處理時, *hhp1-1* 保衛細胞中細胞質濃度的平衡 狀態可能不同於野生株保衛細胞,目前尚不確定其原因。然而使用 Genevestigator 進行 *HHP1* 表現量分析,並未發現光照或避光處理強烈影響表現量的現象,推測 HHP1 在保衛細胞中的作用可能在於影響膜上通道的通透性,或是保衛細胞內 ABA、SA 或乙烯等訊息分子的平衡濃度。

然而三次獨立實驗下 *hhp1-1* 對 ABA 處理的敏感程度趨勢再現性不佳,尚不能 推測 *hhp1-1* 的氣孔行為對 ABA 的敏感性有何不同。實驗發現在相同濃度之 H₂O₂ 及 SNP 等 ABA 下游訊息分子處理下,即使無處理的狀況下 *hhp1-1* 氣孔大於野

42

生型氣孔, *hhp1-1* 與野生株在氣孔關閉能力上無顯著的差異, 顯示 HHP1 缺失應 不影響 ABA 下游 H_2O_2 及 NO 的調控; 若 *hhp1-1* 保衛細胞確實對於 ABA 反 應較不敏感,考量 ABA、 H_2O_2 及 NO 的上下游關係,可推測 HHP1 在保衛細胞 中的作用可能在於影響受器對於 ABA 感知或訊息傳遞,且早先於 H_2O_2 生成的 層次,如胞內 PYR/PYL/RCAR、PP2C 或 SnRK2 的組成比例、胞內 H_2O_2 生成 能力等,而可能是 genomic 或是 non-genomic 的作用。

3.2. hhp1-1 主根生長對於離層酸之抑制

作用較野生株不敏感

在兩次獨立實驗中,ABA 造成的生長抑制皆呈 dose-dependent 情形,顯示在不 含蔗糖之培養基對阿拉伯芥幼苗進行 ABA 處理方式可行 (Figure 5-6 中僅呈現 第二次的實驗結果)。兩次的實驗結果,野生株幼苗在 10 μM ABA 處理的主根生長 較 0 μM ABA 分別減少 52.4% 及 43.8%,而 *hhp1-1* 在兩次獨立實驗中減少的幅 度分別為 30.6% 及 35.8%,因此推測 *hhp1-1* 主根生長受 ABA 之抑制作用較野 生株不明顯,HHP1 在根中的作用可能在於促進 ABA 調控的主根生長抑制。

第四章 未來展望

4.1. 植株氣孔行為探討

比較未經藥劑處理的氣孔行為,可發現 HHP1 缺失之植株 hhp1-1 在 stomatal opening buffer 中光照培養 5 小時後,其氣孔平均開口顯著大於野生株之植株。從 生理反應的角度而言,藉由 in vitro 氣孔行為的實驗,發現在 stomatal opening buffer 中光照培養造成的氣孔開啟,僅能說明被取下之下表皮在光照下,保衛細胞 與外界溶液平衡的結果;栽種於介質上的 hhp1-1 是否有如同在溶液中光照,會有 氣孔大於野生株植株的反應,可藉由紅外線色溫分析,從氣孔開啟造成的旺盛蒸 散作用及蒸散造成的降溫效應,間接推估 hhp1-1 氣孔於充分澆水及充分光照下的 開啟程度;同時也需對不同品系植株間氣孔的成熟比例、數量或密度進行量測, 確立影響蒸散作用強度的主要因子。

4.2. 訊息傳遞物含量及氣孔反應分析

從分子作用的層面而言,HHP1可能影響溶液中保衛細胞內平衡狀態下的滲透壓, 亦即 HHP1 可能作用於細胞膜或胞器膜的通透性調節,調節方向在於抑制氣孔開 啟或促進氣孔關閉。其調節可能直接作用於離子通道,或藉影響訊息傳遞方式間 接作用於離子通道等。因此尚可測試鈣離子或其他可導致氣孔關閉之訊息分子對 突變株氣孔行為的影響,以及在 stomatal opening buffer 中光照培養 5 小時後影響 氣孔開闔之內源訊息傳遞物,如 SA、ABA、H₂O₂、NO 等的含量,進而釐清 HHP1 影響氣孔開啟的原因。

4.3. In vivo HHP1 蛋白質特性探討

目前認為 HHP1 可能是一個膜蛋白,但尚不確定是在何種膜狀構造中,目前建構中能表現螢光蛋白-HHP1 重組蛋白的阿拉伯芥轉殖株,可能會是這個問題的解

答所在。藉由細胞內定位實驗及 protease protection assay,或可瞭解其蛋白質存在 之構造、N端及 C端的指向;帶有螢光蛋白質標記的 HHP1,可藉由免疫共沉澱 實驗找出其潛在之 *in vivo* 交互作用蛋白質,對於 HHP1 和膜通透性以及調控 ABA 作用下的主根發育的關係或能有更進一步發現;另一方面,帶有標記的 HHP1 重組蛋白質亦可利用二維電泳及質譜分析,研究 HHP1 在 ABA 作用下可能 的蛋白質修飾。

4.4. 離層酸訊息傳遞成員組成探討

在不以外源 ABA 訊息傳遞物處理的環境下而呈氣孔較寬的現象,可能與保衛 細胞中訊息傳遞核心的調控因子有關,如 PYR/PYL/RCAR、PP2C、OST1等,可 藉由 real-time PCR 比較突變株與野生株植株中訊息傳遞的核心蛋白質,在基因表 現層次的程度是否有所不同,瞭解 HHP1 缺失之植株在 ABA-responsive 基因的 表現異常,及氣孔行為是否與 ABA 訊息傳遞的差異表現有關。



第五章 圖與表

5.1. 氟孔行為實驗



Figure 5-1. Width of stomata from epidermis incubated under light for 5 hours. Data shown are in mean \pm standard error with n = 60. Significant difference was observed between WT and *hhp1-1* in each experiment (*p* < 0.05).

Table 5-1. LSD test for three replicates for stomatal width under light for 5 hours(* indicates the pairs with significant difference at 5% level)

Multiple Comparisons				
Ι			-	
			LSD	
Treatment	Treatment	Difference	Alpha = 0.05	
WT	hhp1-1*	-0.62	0.28	
	<i>c-hhp1-1</i>	0.19	0.28	
hhp1-1	<i>c-hhp1-1</i> *	0.82	0.28	

II			
			LSD
Treatment	Treatment	Difference	$\mathbf{Alpha} = 0.05$
WT	hhp1-1*	-0.45	0.24
	c-hhp1-1	0.35	0.24
hhp1-1	c-hhp1-1*	0.80	0.24

Multi	ple Co	mparisons

ш			
			LSD
Treatment	Treatment	Difference	Alpha = 0.05
WT	hhp1-1*	-1.17	0.28
	<i>c-hhp1-1</i> *	-0.67	0.28
hhp1-1	<i>c-hhp1-1</i> *	0.51	0.28



Figure 5-2. Lower epidermis of WT (left) and *hhp1-1* (right) under control condition



Figure 5-3. Width of stomata from epidermis incubated under light for 2.5 hours, and then covered with aluminum foil to be sheltered from light for another 2.5 hours.

Data shown are in mean \pm standard error with n = 60. Bars with the same letter(s) are not significantly different at 5% level by Fisher's LSD test.

Table 5-2. LSD test for stomatal width in the dark for 2.5 hours

Multiple Co	omparisons		Grand
Dark			
			LSD
Treatment	Treatment	Difference	Alpha = 0.05
WT	hhp1-1*	-0.39	0.23
	<i>c-hhp1-1</i> *	-0.73	0.23
hhp1-1	<i>c-hhp1-1</i> *	-0.34	0.23

(* indicates the pairs with significant difference at 5% level)



Figure 5-4. Lower epidermis of WT (left) and *hhp1-1* (right) incubated in darkness for 2.5 hours







Table 5-3. LSD test for stomatal width under H_2O_2 treatment for 2.5 hours

(*	indicates	the	pairs	with	significant	difference	at 5%	level)
----	-----------	-----	-------	------	-------------	------------	-------	--------

Multiple Comparisons			
H_2O_2			•
			LSD
Treatment	Treatment	Difference	Alpha = 0.05
WT	hhp1-1	0.10	0.17
	<i>c-hhp1-1</i> *	0.28	0.17
hhp1-1	<i>c-hhp1-1</i> *	0.18	0.17



Figure 5-6. Lower epidermis of WT (left) and *hhp1-1* (right) incubated in 100 μM H_2O_2 for 2.5 hours







Table 5-4. LSD test for stomatal width under SNP treatment for 2.5 hours

(* indicates the p	pairs with	significant	difference a	t 5%	level)
--------------------	------------	-------------	--------------	------	--------

Multiple Comparisons				
SNP	-			
			LSD	
Treatment	Treatment	Difference	Alpha = 0.05	
WT	hhp1-1	-0.19	0.23	
	c-hhp1-1	0.05	0.23	
hhp1-1	<i>c-hhp1-1</i> *	0.24	0.23	



Figure 5-8. Lower epidermis of WT (left) and *hhp1-1* (right) incubated in 50 μM SNP for 2.5 hours









ABA can induce stomatal closure in WT, *hhp1-1* and *c-hhp1-1* backgrounds. The dose-dependent effect of ABA was not significant in three indipendent experiments. Data shown are in mean \pm standard error with n = 60.



Figure 5-10. Lower epidermis of WT (left) and *hhp1-1* (right) incubated in 10 μ M ABA for 2.5 hours



5.2. 主根生長抑制實驗



Figure 5-11. ABA inhibition of primary root growth of WT and *hhp1-1* Data shown are in mean \pm standard error with n = 7. Seedlings grown vertically s on 1/2 MS plates supplied with 3% (w/v) sucrose for 5day were transferred onto minimum medium plates with indicated concentration of ABA and grew for 6 days.



Figure 5-12. *Arabidopsis* seedlings transferred to 1/2 MS medium containing 0 μ M ABA (left), and 10 μ M ABA (right) for 6 days. The edge of squares is 1.35 cm.

參考文獻

- Abrams, S.R., Rose, P.A., Cutler, A.J., Balsevich, J.J., Lei, B., and
 Walker-Simmons, M.K. (1997). 8'-Methylene Abscisic Acid (An Effective and Persistent Analog of Abscisic Acid). Plant Physiol 114, 89-97.
- Bensmihen, S., Giraudat, J., and Parcy, F. (2005). Characterization of three homologous basic leucine zipper transcription factors (bZIP) of the ABI5 family during *Arabidopsis thaliana* embryo maturation. J Exp Bot **56**, 597-603.
- Bensmihen, S., Rippa, S., Lambert, G., Jublot, D., Pautot, V., Granier, F., Giraudat, J., and Parcy, F. (2002). The homologous ABI5 and EEL transcription factors function antagonistically to fine-tune gene expression during late embryogenesis. Plant Cell 14, 1391-1403.
- **Bent, A.F.** (2000). *Arabidopsis in planta* transformation. Uses, mechanisms, and prospects for transformation of other species. Plant Physiol **124**, 1540-1547.
- Bright, J., Desikan, R., Hancock, J.T., Weir, I.S., and Neill, S.J. (2006). ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. Plant J 45, 113-122.
- Chen, C.C., Liang, C.S., Kao, A.L., and Yang, C.C. (2009). HHP1 is involved in osmotic stress sensitivity in *Arabidopsis*. J Exp Bot **60**, 1589-1604.
- Chen, C.C., Liang, C.S., Kao, A.L., and Yang, C.C. (2010). HHP1, a novel signalling component in the cross-talk between the cold and osmotic signalling pathways in *Arabidopsis*. J Exp Bot **61**, 3305-3320.
- Cheng, W.H., Endo, A., Zhou, L., Penney, J., Chen, H.C., Arroyo, A., Leon, P., Nambara, E., Asami, T., Seo, M., Koshiba, T., and Sheen, J. (2002). A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. Plant Cell 14, 2723-2743.
- Desikan, R., Last, K., Harrett-Williams, R., Tagliavia, C., Harter, K., Hooley, R., Hancock, J.T., and Neill, S.J. (2006). Ethylene-induced stomatal closure in *Arabidopsis* occurs via AtrbohF-mediated hydrogen peroxide synthesis. Plant J 47, 907-916.
- Endo, A., Sawada, Y., Takahashi, H., Okamoto, M., Ikegami, K., Koiwai, H., Seo,

M., Toyomasu, T., Mitsuhashi, W., Shinozaki, K., Nakazono, M., Kamiya, Y.,
Koshiba, T., and Nambara, E. (2008). Drought induction of *Arabidopsis*9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase occurs in vascular parenchyma cells. Plant
Physiol 147, 1984-1993.

- Ephritikhine, G., Fellner, M., Vannini, C., Lapous, D., and Barbier-Brygoo, H. (1999). The sax1 dwarf mutant of *Arabidopsis thaliana* shows altered sensitivity of growth responses to abscisic acid, auxin, gibberellins and ethylene and is partially rescued by exogenous brassinosteroid. Plant J 18, 303-314.
- Finkelstein, R.R., and Lynch, T.J. (2000a). The *Arabidopsis* abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. Plant Cell 12, 599-609.
- Finkelstein, R.R., and Lynch, T.J. (2000b). Abscisic acid inhibition of radicle emergence but not seedling growth is suppressed by sugars. Plant Physiol 122, 1179-1186.
- Fujii, H., Verslues, P.E., and Zhu, J.K. (2007). Identification of two protein kinases required for abscisic acid regulation of seed germination, root growth, and gene expression in *Arabidopsis*. Plant Cell **19**, 485-494.
- Fujii, H., Chinnusamy, V., Rodrigues, A., Rubio, S., Antoni, R., Park, S.Y., Cutler, S.R., Sheen, J., Rodriguez, P.L., and Zhu, J.K. (2009). *In vitro* reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. Nature 462, 660-664.
- Fujita, Y., Fujita, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011). ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. J Plant Res 124, 509-525.
- Fujita, Y., Fujita, M., Satoh, R., Maruyama, K., Parvez, M.M., Seki, M., Hiratsu,
 K., Ohme-Takagi, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2005).
 AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that
 enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis*. Plant Cell 17, 3470-3488.
- Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Stange, A., Marten, I., Bauer, H., Ache, P.,
 Matschi, S., Liese, A., Al-Rasheid, K.A., Romeis, T., and Hedrich, R. (2009).
 Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress
 signaling kinase-phosphatase pair. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 21425-21430.
- Hao, F., Zhao, S., Dong, H., Zhang, H., Sun, L., and Miao, C. (2010). Nia1 and Nia2

are involved in exogenous salicylic acid-induced nitric oxide generation and stomatal closure in *Arabidopsis*. J Integr Plant Biol **52**, 298-307.

- Hauser, F., Waadt, R., and Schroeder, J.I. (2011). Evolution of abscisic acid synthesis and signaling mechanisms. Curr Biol 21, R346-355.
- Hruz, T., Laule, O., Szabo, G., Wessendorp, F., Bleuler, S., Oertle, L., Widmayer, P., Gruissem, W., and Zimmermann, P. (2008). Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. Adv Bioinformatics 2008, 420747.
- Hsieh, M.H., and Goodman, H.M. (2005). A novel gene family in *Arabidopsis* encoding putative heptahelical transmembrane proteins homologous to human adiponectin receptors and progestin receptors. J Exp Bot **56**, 3137-3147.
- Joshi-Saha, A., Valon, C., and Leung, J. (2011a). Abscisic acid signal off the STARting block. Mol Plant 4, 562-580.
- Joshi-Saha, A., Valon, C., and Leung, J. (2011b). A brand new START: abscisic acid perception and transduction in the guard cell. Sci Signal 4, re4.
- Kang, J., Hwang, J.U., Lee, M., Kim, Y.Y., Assmann, S.M., Martinoia, E., and Lee,
 Y. (2010). PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. Proc Natl Acad Sci U S A 107, 2355-2360.
- Kang, J.Y., Choi, H.I., Im, M.Y., and Kim, S.Y. (2002). Arabidopsis basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. Plant Cell 14, 343-357.
- Kim, S.Y., Ma, J., Perret, P., Li, Z., and Thomas, T.L. (2002). Arabidopsis ABI5 subfamily members have distinct DNA-binding and transcriptional activities. Plant Physiol 130, 688-697.
- Kinoshita, T., and Shimazaki, K. (1999). Blue light activates the plasma membrane H⁺-ATPase by phosphorylation of the C-terminus in stomatal guard cells. EMBO J 18, 5548-5558.
- Koiwai, H., Nakaminami, K., Seo, M., Mitsuhashi, W., Toyomasu, T., and Koshiba,
 T. (2004). Tissue-specific localization of an abscisic acid biosynthetic enzyme,
 AAO3, in *Arabidopsis*. Plant Physiol 134, 1697-1707.
- Koornneef, M., Jorna, M.L., Brinkhorst-van der Swan, D.L.C., and Karssen, C.M. (1982). The isolation of abscisic acid (ABA) deficient mutants by selection of

induced revertants in non-germinating gibberellin sensitive lines of *Arabidopsis thaliana*. TAG Theoretical and Applied Genetics **61**, 385-393.

- Krochko, J.E., Abrams, G.D., Loewen, M.K., Abrams, S.R., and Cutler, A.J. (1998).
 (+)-Abscisic acid 8'-hydroxylase is a cytochrome P450 monooxygenase. Plant Physiol 118, 849-860.
- Kuromori, T., Miyaji, T., Yabuuchi, H., Shimizu, H., Sugimoto, E., Kamiya, A., Moriyama, Y., and Shinozaki, K. (2010). ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses. Proc Natl Acad Sci U S A 107, 2361-2366.
- Kwak, J.M., Mori, I.C., Pei, Z.M., Leonhardt, N., Torres, M.A., Dangl, J.L., Bloom,
 R.E., Bodde, S., Jones, J.D., and Schroeder, J.I. (2003). NADPH oxidase
 AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. EMBO J 22, 2623-2633.
- Leon-Kloosterziel, K.M., van de Bunt, G.A., Zeevaart, J.A., and Koornneef, M. (1996). *Arabidopsis* mutants with a reduced seed dormancy. Plant Physiol **110**, 233-240.
- Li, J.H., Liu, Y.Q., Lu, P., Lin, H.F., Bai, Y., Wang, X.C., and Chen, Y.L. (2009). A signaling pathway linking nitric oxide production to heterotrimeric G protein and hydrogen peroxide regulates extracellular calmodulin induction of stomatal closure in *Arabidopsis*. Plant Physiol **150**, 114-124.
- Lin, B.L., Wang, H.J., Wang, J.S., Zaharia, L.I., and Abrams, S.R. (2005). Abscisic acid regulation of heterophylly in *Marsilea quadrifolia L*.: effects of R-(-) and S-(+) isomers. J Exp Bot **56**, 2935-2948.
- Lu, D., Zhang, X., Jiang, J., An, G.Y., Zhang, L.R., and Song, C.P. (2005). NO may function in the downstream of H₂O₂ in ABA-induced stomatal closure in *Vicia faba*. Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao 31, 62-70.
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A., and Grill, E. (2009). Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. Science 324, 1064-1068.
- Marten, H., Hedrich, R., and Roelfsema, M.R. (2007). Blue light inhibits guard cell plasma membrane anion channels in a phototropin-dependent manner. Plant J 50, 29-39.

- Melcher, K., Ng, L.M., Zhou, X.E., Soon, F.F., Xu, Y., Suino-Powell, K.M., Park,
 S.Y., Weiner, J.J., Fujii, H., Chinnusamy, V., Kovach, A., Li, J., Wang, Y.,
 Peterson, F.C., Jensen, D.R., Yong, E.L., Volkman, B.F., Cutler, S.R., Zhu, J.K.,
 and Xu, H.E. (2009). A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by
 abscisic acid receptors. Nature 462, 602-608.
- Miyazono, K., Miyakawa, T., Sawano, Y., Kubota, K., Kang, H.J., Asano, A.,
 Miyauchi, Y., Takahashi, M., Zhi, Y., Fujita, Y., Yoshida, T., Kodaira, K.S.,
 Yamaguchi-Shinozaki, K., and Tanokura, M. (2009). Structural basis of abscisic acid signalling. Nature 462, 609-614.
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum 15, 473-497.
- Nakashima, K., Fujita, Y., Kanamori, N., Katagiri, T., Umezawa, T., Kidokoro, S., Maruyama, K., Yoshida, T., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009). Three *Arabidopsis* SnRK2 protein kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3, involved in ABA signaling are essential for the control of seed development and dormancy. Plant Cell Physiol 50, 1345-1363.
- Nambara, E., and Marion-Poll, A. (2005). Abscisic acid biosynthesis and catabolism. Annu Rev Plant Biol 56, 165-185.
- Narusaka, Y., Nakashima, K., Shinwari, Z.K., Sakuma, Y., Furihata, T., Abe, H., Narusaka, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis* rd29A gene in response to dehydration and high-salinity stresses. Plant J 34, 137-148.
- Neill, S., Barros, R., Bright, J., Desikan, R., Hancock, J., Harrison, J., Morris, P.,
 Ribeiro, D., and Wilson, I. (2008). Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. J Exp Bot 59, 165-176.
- Nemhauser, J.L., Hong, F., and Chory, J. (2006). Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. Cell 126, 467-475.
- Nishimura, N., Hitomi, K., Arvai, A.S., Rambo, R.P., Hitomi, C., Cutler, S.R., Schroeder, J.I., and Getzoff, E.D. (2009). Structural mechanism of abscisic acid

binding and signaling by dimeric PYR1. Science **326**, 1373-1379.

- Nishimura, N., Sarkeshik, A., Nito, K., Park, S.Y., Wang, A., Carvalho, P.C., Lee, S.,
 Caddell, D.F., Cutler, S.R., Chory, J., Yates, J.R., and Schroeder, J.I. (2010).
 PYR/PYL/RCAR family members are major in-vivo ABI1 protein phosphatase
 2C-interacting proteins in *Arabidopsis*. Plant J 61, 290-299.
- Park, S.Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D.R., Fujii, H., Zhao, Y., Lumba, S., Santiago, J., Rodrigues, A., Chow, T.F., Alfred, S.E., Bonetta, D., Finkelstein, R., Provart, N.J., Desveaux, D., Rodriguez, P.L., McCourt, P., Zhu, J.K., Schroeder, J.I., Volkman, B.F., and Cutler, S.R. (2009). Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. Science 324, 1068-1071.
- Pei, Z.M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klusener, B., Allen, G.J., Grill, E., and Schroeder, J.I. (2000). Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. Nature 406, 731-734.
- Rook, F., Corke, F., Card, R., Munz, G., Smith, C., and Bevan, M.W. (2001). Impaired sucrose-induction mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signalling. Plant J 26, 421-433.
- Saito, S., Hirai, N., Matsumoto, C., Ohigashi, H., Ohta, D., Sakata, K., and Mizutani, M. (2004). *Arabidopsis* CYP707As encode (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid. Plant Physiol 134, 1439-1449.
- Santiago, J., Dupeux, F., Round, A., Antoni, R., Park, S.Y., Jamin, M., Cutler, S.R., Rodriguez, P.L., and Marquez, J.A. (2009a). The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid. Nature 462, 665-668.
- Santiago, J., Rodrigues, A., Saez, A., Rubio, S., Antoni, R., Dupeux, F., Park, S.Y., Marquez, J.A., Cutler, S.R., and Rodriguez, P.L. (2009b). Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs. Plant J 60, 575-588.
- Sato, A., Sato, Y., Fukao, Y., Fujiwara, M., Umezawa, T., Shinozaki, K., Hibi, T., Taniguchi, M., Miyake, H., Goto, D.B., and Uozumi, N. (2009). Threonine at position 306 of the KAT1 potassium channel is essential for channel activity and is a target site for ABA-activated SnRK2/OST1/SnRK2.6 protein kinase. Biochem J

424, 439-448.

- Schwartz, S.H., and Zeevaart, J.A.D. (2010). Abscisic Acid Biosynthesis and Metabolism. Plant Hormones, P.J. Davies, ed (Springer Netherlands), pp. 137-155.
- Seo, M., Peeters, A.J., Koiwai, H., Oritani, T., Marion-Poll, A., Zeevaart, J.A., Koornneef, M., Kamiya, Y., and Koshiba, T. (2000). The *Arabidopsis* aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 12908-12913.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Seki, M. (2003). Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. Curr Opin Plant Biol 6, 410-417.
- Sirichandra, C., Gu, D., Hu, H.C., Davanture, M., Lee, S., Djaoui, M., Valot, B., Zivy, M., Leung, J., Merlot, S., and Kwak, J.M. (2009). Phosphorylation of the *Arabidopsis* Atrohf NADPH oxidase by OST1 protein kinase. FEBS Lett 583, 2982-2986.
- Sun, L.R., Hao, F.S., Lu, B.S., and Ma, L.Y. (2010). AtNOA1 modulates nitric oxide accumulation and stomatal closure induced by salicylic acid in *Arabidopsis*. Plant Signal Behav 5, 1022-1024.
- Umezawa, T., Nakashima, K., Miyakawa, T., Kuromori, T., Tanokura, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010). Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport. Plant Cell Physiol 51, 1821-1839.
- Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 11632-11637.
- Walker-Simmons, M.K., Anderberg, R.J., Rose, P.A., and Abrams, S.R. (1992). Optically pure abscisic Acid analogs-tools for relating germination inhibition and gene expression in wheat embryos. Plant Physiol **99**, 501-507.
- Yin, P., Fan, H., Hao, Q., Yuan, X., Wu, D., Pang, Y., Yan, C., Li, W., Wang, J., and Yan, N. (2009). Structural insights into the mechanism of abscisic acid signaling by PYL proteins. Nat Struct Mol Biol 16, 1230-1236.
- Zaharia, L., Walker-Simmon, M., Rodríguez, C., and Abrams, S. (2005). Chemistry

of Abscisic Acid, Abscisic Acid Catabolites and Analogs. Journal of Plant Growth Regulation **24**, 274-284.

- Zhao, X., Qiao, X.R., Yuan, J., Ma, X.F., and Zhang, X. (2012). Nitric oxide inhibits blue light-induced stomatal opening by regulating the K⁺ influx in guard cells. Plant Sci 184, 29-35.
- Zhou, R., Cutler, A.J., Ambrose, S.J., Galka, M.M., Nelson, K.M., Squires, T.M., Loewen, M.K., Jadhav, A.S., Ross, A.R., Taylor, D.C., and Abrams, S.R. (2004). A new abscisic acid catabolic pathway. Plant Physiol 134, 361-369.
- Zou, J., Abrams, G.D., Barton, D.L., Taylor, D.C., Pomeroy, M.K., and Abrams,
 S.R. (1995). Induction of Lipid and Oleosin Biosynthesis by (+)-Abscisic Acid and Its Metabolites in Microspore-Derived Embryos of *Brassica napus* L.cv Reston (Biological Responses in the Presence of 8'-Hydroxyabscisic Acid). Plant Physiol 108, 563-571.
- **陳勁中**.(2009). 阿拉伯芥新穎蛋白質 HHP1 之功能研究. 國立臺灣大學微生物與 生化學研究所博士論文.



問答集

時間:中華民國一百零一年七月十九日

地點:國立臺灣大學農化新館 509 室

廖憶純老師部份

問:HHP1 蛋白質功能是否為特定的受器或離子通道?

- 答:目前指出 HHP1 與人類 adiponectin receptor 有序列上的相似;在植物中尚未 有研究指出其與特定受質結合,或具有類似離子通道的活性。
- 問:氣孔實驗中推論 HHP1 影響保衛細胞中離子濃度平衡,是根據什麼樣的內容 推測?
- 答:一對保衛細胞相鄰一側的細胞壁較厚,離子濃度低時水份進入細胞,相鄰一 側的細胞壁伸張程度不如另外一側,而使氣孔被撐大;離子濃度高時水份離 開保衛細胞,造成氣孔縮小。作出此一推測,是因為在光照誘使氣孔增大及 避光誘使氣孔縮小的結果中發現,相較於野生株,此二處理下 hhp1-1 有較大 的氣孔,間接推測 hhp1-1 保衛細胞中的離子濃度可能低於野生株,進而推測 HHP1 可能參與細胞中的離子濃度的調節。
- 問:假設 HHP1 不是離子通道,是以何種方式調節離子的平衡?
- 答:調節方式可能有多種,在未來展望中提及。可能藉著調控其他蛋白質的活性, 或是因特定基因表現受到影響造成氣孔有不同的行為。可能經蛋白質間的交 互作用影響訊息傳遞或直接調節離子通道活性;在 ABA 處理下 *hhp1-1* 的一 些 ABA-responsive 基因的表現量低於野生株,亦有可能是這些基因表現的差 異影響了 *hhp1-1* 保衛細胞中離子濃度的平衡。
- 問:未進行 ABA 訊息分子的處理之下, hhp1-1 的氣孔較野生株為大,在第二次 ABA 處理的重覆實驗當中,0μM ABA 的處理是否等同於未進行 ABA 訊息

分子的處理?然而其結果 hhp1-1 的氣孔較野生株為小?論文中提到的一致 性不佳是指?

- 答:0µMABA 的處理等同於未進行 ABA 訊息分子處理,不一致性指的是突變 株與野生株對 ABA 的反應趨勢,在處理下兩種植株的氣孔皆能夠關閉,但 野生株與 *hhp1-1* 氣孔開口大小的相對關係在幾次重覆實驗中,並非呈現一者 一致大於另一者的現象。
- 問:若將各植株 0μM ABA 的氣孔寬度定為百分之百以進行標準化,是否能夠比 較突變株氣孔的敏感程度?是否適用於你的實驗結果?
- 答:比較敏感程度應該將處理結果對未處理的結果進行標準化,仍然可能有再現 性不佳的情形,將再次作圖比較。
- 建議:圖 5-3 中野生株和 hhp1-1 同組,但和互補株則不同組,如果標準化後是否仍有差異,是可以比較敏感性意義的。論文結果與討論當中的標題太快進入結論了,數據仍有討論的空間。

李昆達老師部份

- 問:數據的不一致性是否有意義?其來源在於?如果現象本身存在著不一致性, 實驗時不能因其不一致而一直進行實驗以使結果一致。
- 答:材料、操作及測量之間或多或少存在著差異,已盡量控制使材料條件及操作、 測量的標準趨於一致,但看來仍有進步的空間。
- 問:如果在不同場合下看到 ABA 處理的三重覆實驗結果圖,會作出什麼樣的推論?三次重覆實驗中無處理的狀況下結果是否一致?
- 答:三種不同的植株都會因 ABA 處理而有氣孔開口變小的現象,三次重覆實驗 在未處理下的開口大小平均值相近,皆在 4 µm 左右,然第二次重覆實驗下 未處理的 *hhp1-1* 氣孔開口大小的相對關係並不同於另外兩次重覆實驗,當中 可能有誤差。

- 問:實驗中使用的補足株是否自己建立?是否確認其 T-DNA 的嵌入情形、位置? mRNA 及蛋白質的表現?學長留下的材料是否可用?是否有可能拿錯種子? 答:使用的補足株是由陳勁中學長建立,T-DNA 嵌入及 mRNA 表現學長有確認 過;目前用的補足株種子,其親本經梁景興學長以 PCR 的方式確認其基因型 為 T-DNA 嵌入的同型合子,但自己沒有再確認。
- 問:根長實驗用中只用一種補足株,在實驗結果中 hhp1-1 和補足株的反應相當, 這樣的結果是否能說明補足株的主根生長狀況被回復了?建議再確認補足株 的基因表現狀況。
- 答:補足株的主根生長狀況可能沒有被回復,應該再檢驗使用材料的基因型及 mRNA 表現。
- 問:大視野相片想呈現的是? 為何不用單一氣孔特寫?
- 答:一張大視野相片通常有多達 20 個氣孔,我想使用這樣的相片呈現處理下各 氣孔開口大小的差異,即使在光照促使開啟及黑暗促使關閉的處理下,也會 出現偏小或偏大的氣孔;使用單一氣孔的特寫無法呈現這樣的現象。

楊健志老師部份

- 問:是否能夠使用同一下表皮樣品進行不同濃度的處理?即將同一塊下表皮在 0 μMABA 處理之後觀察,再以不同濃度 ABA 進行處理。
- 答:無法如此,因為處理的時間長,而製作玻片後水份流失將影響保衛細胞的滲透壓,觀察時顯微鏡的強光都不利於進行後續不同濃度的處理。實驗時能夠 作到使用同一葉片的下表皮進行不同濃度 ABA 或不同藥劑的處理,在撕取 下表皮之後將之分成若干小塊以進行之,並假設來自同一葉片的不同下表皮 其氣孔反應應相當。

黃楓婷老師部份

問:下表皮先經過光照處理使氣孔打開,是否在處理前先觀察開始情形?處理後 氣孔開口測得的最大及最小值?
- 答:下表皮經過 2.5 小時光照處理後,會先取其中一片下表皮檢查氣孔是否開啟, 確實開啟才進行後續的避光及藥劑處理。氣孔的開口可達到 7 µm,測得最小 的僅略大於 1 µm。
- 問:氣孔處理的正控制組及負控制組分別為何,如何支持進行的操作及處理可行? 答:光照促使氣孔開啟而黑暗使氣孔關閉,操作結果符合預期,因此處理是可行 的;藥劑處理如 ABA、SNP、過氧化氫等則是參考他人的研究結果及處理濃 度,如預期觀察到氣孔關閉的行為。
- 問:ABA 處理預期的結果是氣孔關閉,第二次 ABA 處理的重覆實驗中 10μM ABA 的關閉情形不如1mM ABA,是出現了什麼樣的問題?
- 答:由於下表皮上有細小的毛容易殘留氣泡,使得下表皮未能完全接觸藥劑,而 未充分受到 ABA 的作用。
- 問:在氣孔處理結果圖中的 a、b、c 代表什麼?
- 答:不同的字母代表統計上顯著不同的組別。在測得氣孔開口大小之後會進行 ANOVA 分析三種植株中是任兩者是否存在顯著的差異,有則以 Fisher's LSD 方式鑑定有差異的組別,有不同字母者是統計上顯著不同的組合,而有相同 字母者則是在統計上無顯著差異的組合。