

國立臺灣大學生命科學院生命科學系



碩士論文

Department of Life Science

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

大岩桐乙烯反應因子 *SsERF-1* 對花瓣生長的調控

The Role of *Sinningia speciosa* Ethylene Response

Factor-1 (SsERF-1) in Petal Growth

朱苡晴

Yii-Chyng Chu

指導教授：王俊能 博士

Advisor：Chun-Neng Wang, Ph.D

中華民國 112 年 7 月

July 2023

誌謝



進入了台大這個不熟悉更充滿挑戰的新環境，這裡令我憧憬卻又時常因排山倒海的壓力而感到迷惘，非常感謝王俊能老師這幾年來的指導和叮嚀，不僅教導我做學問的精神與生活的態度，學會報告的精髓與獨立思考，更使我能夠重新審視自己的不足，從中學習進步。同時也感謝陳仁治老師、吳俊達老師及蔡皇龍老師在我的研究過程中提供了許多建議和幫助，使我能夠更加完善每一個實驗設計、並思考所有結果的意義，組建出完整又吸引人的故事，更謝謝三位老師擔任口試委員，在論文寫作及未來規劃給予細心的指正與方向，以及中興大學楊長賢老師提供我們進行阿拉伯芥轉殖的載體，使我得以完成這本成就感滿滿的碩士論文。

感謝所有 1207 實驗室的成員陪伴我一起走過這段日子，昭君學姐、佳晴學姐和冠霆學長教導了我許多實驗的規劃和操作，更時常關心照顧我的生活；哲廷、存瑩、雅欣、文萱、育心和婷宇是我最信任也要好的夥伴，這些一起笑鬧、出外遊玩、彼此打氣互相扶持的回憶都是我最珍貴的寶藏；也謝謝在我一路走來，育翎學姐、正江學長、郭昕、欣澤、俊彬、俊佑、羿凱、育青、多加、Manju、聖淮和廣鈞帶給我許多幫助和快樂，讓實驗室增添更多歡笑。最後我也要感謝我的家人，我的爸爸、媽媽和在美國的哥哥及大嫂，在種種的挫折與壓力下，每一句鼓勵和建議都是支持我完成這份學位的動力。

在這幾年的學習生涯中，讓我重新審視自己，了解到自己是多麼天真和渺小，還有太多太多需要改進的地方，我會帶著所有在這裡獲得的知識和成長，努力讓自己成為一個更好、更能抬頭挺胸向前邁進的人。

苡晴 中華民國 112 年 7 月 25 日

中文摘要



為了適應環境並有效的吸引傳粉者以達成繁殖之目的，花朵豐富的多樣性便是植物演化的重要一環，其中，兩側對稱花被認為是目前被子植物主要的演化趨勢，其不同花瓣會沿單一對稱軸向兩側呈鏡面對稱分佈，使傳粉者得以自特定的角度進入花朵中，促使更為精確的花粉傳播和柱頭接收，進而提升傳粉效率與繁殖成功率。而花朵的對稱性的建立已在金魚草 (*Antirrhinum majus*) 中被廣泛研究，TCP 轉錄因子中的 *CYCLOIDEA* (*CYC*) 基因會局限在背側花瓣高度表現，透過調節花瓣細胞增殖及細胞延長，使背側花瓣發育出不同於腹側及兩側花瓣的獨特性狀，然而，是否有未知的 *CYC* 潛在下游基因或其他調控路徑參與其中，以及它們是如何共同調節不同物種花朵中這些龐大的形態差異，都仍有許多尚未明瞭之處。為了找尋 *CYC* 的潛在下游，我們選用著名的園藝觀賞植株大岩桐 (*Sinningia speciosa*) 作為研究材料，並透過背腹側花瓣的轉錄體分析及雙螢光素酶報告基因檢測實驗等過往研究，篩選出目標基因 *SsERF-1* 很可能為 *SsCYC* 之潛在下游，參與大岩桐背腹側花瓣的差異性生長。

為了探討 *SsERF-1* 與乙烯對大岩桐花朵生長發育的關聯性，我們首先建立了 *SsERF-1* 與模式物種阿拉伯芥 ERFs 的親緣關係樹，確立其屬於 Group IXa 子群中，具有保守的 AP2/ERF domain 與 CMIX-3 motif；接著透過 qRT-PCR 檢驗 *SsERF-1* 在大岩桐第 3、5、8 期花苞背腹側花瓣中的表現量，確實與 *SsCYC* 的表現模式一致，皆在背側花瓣中有較高的表現；而將大岩桐施加乙烯前驅物 ACC 處理後會在短時間內輕微促進 *SsERF-1* 的表現，且會透過抑制細胞延長使花苞生長較小；此外，更透過建立 *SsERF-1* 的阿拉伯芥異位表達轉植株進行功能性分析，發現 *SsERF-1* 會延遲植株自營養期過渡至繁殖期的時間，且有抑制株高與節間的趨勢，而在花朵方面，*SsERF-1* 則會透過抑制細胞延長使轉植株

的花瓣較小。以上結果顯示乙烯前驅物 ACC 確實會抑制大岩桐花苞的大小，而 *SsERF-1* 亦會受到 ACC 促進，且會透過調控細胞延長抑制轉植株花瓣大小的生長。

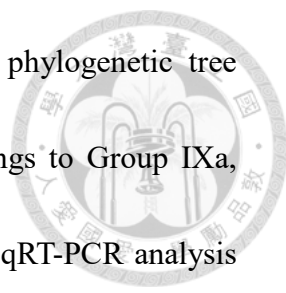


關鍵詞：大岩桐、兩側對稱性、*CYCLOIDEA*、乙烯、乙烯反應因子、花瓣大小、細胞延長

Abstract



In order to adapt to and attract pollinators for reproductive success, flower diversity plays an important role in plant evolution. Floral zygomorphy (bilateral symmetry), in which different petals are divided into two equal halves along a single axis of symmetry, has been considered the major trend in angiosperm evolution. Zygomorphic flowers allow pollinators to enter the flower at a specific angle to improve the accuracy of pollen deposition onto stigma, increasing pollination efficiency and reproductive success. The establishment of floral symmetry has been widely studied in *Antirrhinum majus*. *CYCLOIDEA* (*CYC*), which belongs to TCP transcription factor family, is highly expressed in dorsal petal and create dorsal identity by regulating cell proliferation and expansion. However, which downstream gene or regulatory network are associated with *CYC* and how they operate to establish the morphological differences are still unknown. To search for downstream of *CYC*, we use the famous horticultural plant *Sinningia speciosa* as experimental material and select *SsERF-I* as target gene via RNA-seq data analysis and dual-luciferase assay from previous work. These indicate that *SsERF-I* might be the potential downstream of *SsCYC* and participate in floral development and dorsiventral differential growth in *S. speciosa*.



To uncover the phylogenetic relationship of *SsERF-1*, the phylogenetic tree reconstructed from *Arabidopsis* ERFs showed that *SsERF-1* belongs to Group IXa, containing conserved AP2/ERF domain and CMIX-3 motif. Next, qRT-PCR analysis revealed that the expression pattern of *SsERF-1* was consistent with *SsCYC* in which it expressed higher in dorsal petals than that in ventral petal. Moreover, the expression of *SsERF-1* could be briefly induced by ethylene precursor ACC within a short time. Also, ACC treatment in *S. speciosa* resulted in smaller flower buds as a result of reduced petal cell expansion. On the other hand, ectopic expression of *SsERF-1* in transgenic *Arabidopsis* plants showed that *SsERF-1* would delay the transition from vegetative to reproductive phase, and slightly inhibit plant height and internode length. Furthermore, ectopic expression of *SsERF-1* caused smaller petals, regulated by inhibition of cell expansion. These results demonstrated that ethylene precursor ACC would inhibit flower bud size in *S. speciosa*, and induce the expression of *SsERF-1*. Also, *SsERF-1* would inhibit petal size in transgenic plants by regulating cell expansion.

Keywords: *Sinningia speciosa* • Floral zygomorphy • *CYCLOIDEA* • Ethylene • Ethylene response factor • Petal size • Cell expansion

目錄



誌謝	II
中文摘要	III
Abstract	V
目錄	VII
圖目錄	X
附錄圖表目錄	XII
縮寫	XIII
第一章 前言	1
1.1 花朵的對稱性及其在被子植物演化的重要性	1
1.2 花朵對稱性建立的調控機制 (<i>CYC-RAD-DIV</i>)	1
1.2.1 <i>CYCLOIDEA</i> (<i>CYC</i>) 屬於 TCP 轉錄因子家族 Class II 基因	1
1.2.2 金魚草 (<i>Antirrhinum majus</i>) 調控花朵對稱性的 <i>CYC-RAD-DIV</i> 網絡	2
1.2.3 <i>CYC-RAD-DIV</i> 在所有被子植物物種中並不保守	3
1.3 大岩桐 (<i>Sinningia speciosa</i>) 為研究花朵對稱性的良好植物材料	4
1.3.1 苦苣苔科 (<i>Gesneriaceae</i>) 具有豐富的花朵多樣性及對稱性反轉 ..	4
1.3.2 大岩桐的花朵發育及背腹側花瓣性狀差異	4
1.4 大岩桐背腹側花瓣中具有差異表現的潛在 <i>SsCYC</i> 下游基因	8
1.4.1 <i>SsCYC</i> 不僅調控花朵對稱性，亦影響花瓣形狀、大小及花色等性 狀	8
1.4.2 透過大岩桐 RNA-seq 篩選潛在的 <i>SsCYC</i> 下游基因	8
1.5 乙烯反應因子 (ERF) 及其對植物發育的調控	9
1.5.1 ERF 隸屬於 AP2/ERF 轉錄因子家族	9

1.5.2 <i>ERF</i> 基因對植物營養器官的生長發育扮演重要角色	9
1.5.3 <i>ERF</i> 基因對植物繁殖器官生長發育及分化的調控	10
1.6 乙烯及乙烯訊息傳導路徑在植物生長發育扮演的角色	10
1.6.1 乙烯及乙烯訊息傳導路徑為重要的植物激素調控網絡	10
1.6.2 乙烯的三相反應 (Ethylene Triple Response)	11
1.6.3 乙烯及乙烯傳導路徑對植物營養器官的生長發育扮演重要角色	11
1.6.4 乙烯及乙烯傳導路徑影響植物繁殖器官的發育及花朵盛開	12
1.7 研究目的	13
第二章 材料與方法	14
2.1 研究材料與生長條件	14
2.2 <i>ERF</i> 轉錄因子家族親緣關係樹的建立	14
2.3 大岩桐總體 RNA 萃取及反轉錄	15
2.4 即時聚合酶連鎖反應 (Real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) ..	15
2.5 大岩桐花苞的荷爾蒙處理	17
2.6 大岩桐花苞的透明法 (Clearing Method) 及細胞面積計算	17
2.7 大岩桐 <i>SsERF-I</i> 分離及阿拉伯芥異位表達轉殖載體的構築	18
2.8 農桿菌勝任細胞製備與轉型作用	22
2.9 阿拉伯芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>) 的無菌播種與栽培	23
2.10 阿拉伯芥基因異位表達轉殖	23
2.11 阿拉伯芥轉殖株播種與篩選	24
2.12 阿拉伯芥 gDNA 粗萃取	25
2.13 反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)	26
2.14 阿拉伯芥轉殖株的乙烯三相反應檢驗 (Triple Response Assay)	27
2.15 阿拉伯芥轉殖株花瓣面積計算及透明法 (Clearing Method)	28
2.16 統計分析	28

第三章 結果	29
3.1 <i>SsERF-1</i> 的親緣關係分析	29
3.2 大岩桐發育過程 <i>SsERF-1</i> 在背腹側花瓣的表現	33
3.3 乙烯前驅物 ACC 處理會透過調控細胞延長來抑制大岩桐花朵的生長	35
3.4 大岩桐經 ACC 處理後 <i>SsERF-1</i> 表現模式	41
3.5 <i>SsERF-1</i> 可能並不參與植株對乙烯接收傳遞及敏感性	43
3.6 <i>SsERF-1</i> 會減緩阿拉伯芥轉植株的生長速度	46
3.7 <i>SsERF-1</i> 會輕微抑制阿拉伯芥轉植株節間的生長及最終株高	52
3.8 <i>SsERF-1</i> 會透過抑制細胞延長使轉植株產生較小的花瓣	54
第四章 討論	60
4.1 乙烯及乙烯調控路徑對花朵生長的調控	60
4.2 乙烯反應因子 Group IX 及在親緣關係上 <i>SsERF-1</i> 可能扮演的調控角 色	62
4.3 <i>SsERF-1</i> 會在短時間內受乙烯刺激而被輕微誘導，但不影響植株對乙烯 接收傳遞的敏感性	64
4.4 <i>SsERF-1</i> 對植株自營養期進入生殖期時間的調控	67
4.5 <i>SsERF-1</i> 對於花瓣大小及花瓣細胞延長的調控	68
4.6 <i>SsERF-1</i> 與乙烯對大岩桐背腹側花瓣差異生長的調控模組	69
第五章 結論與未來展望	73
第六章 參考資料	75
第七章 圖表附錄	92

圖目錄



圖一、大岩桐 ‘Espirito Santo’ 的花朵外觀及花期定義	7
圖二、阿拉伯芥的乙烯反應因子 (ERFs) 與 <i>SsREF-1</i> 之基因親緣演化樹.....	32
圖三、大岩桐第 3、5、8 期花苞 <i>SsERF-1</i> 與 <i>SsCYC</i> 在背腹側花瓣的表現模式	34
圖四、大岩桐第 5 期花苞經 0.1 mM 乙烯前驅物 ACC 處理後的花苞形態...	37
圖五、大岩桐第 5 期花苞經 0.1 mM 乙烯前驅物 ACC 處理後的花筒長度及 花苞寬度.....	38
圖六、大岩桐第 5 期花苞經 0.1 mM 乙烯前驅物 ACC 處理後花瓣上表皮細 胞形態.....	39
圖七、大岩桐第 5 期花苞經 0.1 mM 乙烯前驅物 ACC 處理後花瓣上表皮細 胞面積.....	40
圖八、大岩桐第 5 期花苞經 0.1 mM 乙烯前驅物 ACC 處理不同時間後 <i>SsERF-1</i> 基因表現模式	42
圖九、黑暗環境 <i>SsERF-1</i> 阿拉伯芥轉殖株幼苗對乙烯的三相反應 (Ethylene Triple Response Assay) 結果.....	45
圖十、長日照環境下 <i>SsERF-1</i> 阿拉伯芥轉殖株的開花時間及開花時簇生葉數量	49
圖十一、長日環境株齡 4-5 週 <i>SsERF-1</i> 阿拉伯芥轉殖株的植株、花朵形態及株 高.....	51
圖十二、長日照環境下 <i>SsERF-1</i> 阿拉伯芥轉殖株主莖節間長度及最終株高	53
圖十三、長日照環境下 <i>SsERF-1</i> 阿拉伯芥轉殖株的花朵、萼片、花瓣外觀及花 瓣面積.....	57
圖十四、長日照環境 <i>SsERF-1</i> 阿拉伯芥轉殖株花瓣上表皮基部、遠端細胞外形	

態.....	58
圖十五、長日照環境 <i>SsERF-1</i> 阿拉伯芥轉殖株花瓣基部、遠端上表皮細胞面積	59
圖十六、 <i>SsCYC</i> 與 <i>SsERF-1</i> 於大岩桐花苞發育過程中可能的調控網絡.....	72

附錄圖表目錄



附錄表一、 <i>SsERF-1</i> 與 <i>SsCYC</i> 之 編碼序列 (CDS) 全長.....	92
附錄表二、 <i>SsERF-1</i> 阿拉伯芥轉殖株構築之引子表	94
附錄表三、以 RT-PCR 及 qRT-PCR 測量基因表現之引子表.....	95
附錄表四、大岩桐第 5 期花苞進行 0.1 mM 乙烯前驅物 ACC 處理後背側花 瓣細胞大小的變化量.....	96
附錄表五、大岩桐第 5 期花苞進行 0.1 mM 乙烯前驅物 ACC 處理後腹側花 瓣細胞大小的變化量.....	97
附錄圖一、以最大概似估計統計法建立之乙烯反應因子 (ERFs) 基因親緣演化 樹.....	98
附錄圖二、pEpyon-22K 載體圖譜.....	99
附錄圖三、pEpyon-2aK 載體圖譜	100
附錄圖四、pEpyon-2bK 載體圖譜.....	101
附錄圖五、 <i>SsERF-1</i> 阿拉伯芥異位表達轉殖載體的構築	103
附錄圖六、長日照環境下 <i>SsERF-1</i> 阿拉伯芥轉殖株另一獨立品系之性狀	105
附錄圖七、 <i>SsERF-1</i> 阿拉伯芥異位表達轉殖株的 RT-PCR 確認.....	106
附錄圖八、 <i>SsERF-1</i> 阿拉伯芥異位表達轉殖株另一獨立品系的 RT-PCR 確認	107

縮寫



ACC	1-aminocyclopropane-1-carboxylate
ACO	1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid oxidase
ACS	1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase
AP2/ERF	APETALA2/Ethylene Responsive Factor
BAP	6-benzyl amino purine
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
cDNA	complementary DNA
CDS	Coding sequence
CESA	Cellulose synthase
CTR	CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE
<i>CYC</i>	<i>CYCLOIDEA</i>
<i>DICH</i>	<i>DICHOTOMA</i>
<i>DIV</i>	<i>DIVARIVATA</i>
DNA	Deoxyribonucleic acid
DRIF	DIV-and-RAD-interacting-factor
EGase	Endo-1,4-β-D-glucanase
EIL	ETHYLENE INSENSITIVE 3-Like
EIN	ETHYLENE INSENSITIVE 3
ERF	Ethylene response factor
ETR	Ethylene receptor
FB	Flower bud
gDNA	Genomic DNA
GFP	Green fluorescent protein

IAA	Indole-3-acetic acid
LB	Luria-Bertani
MBP	MADS-BOX PROTEIN
MS	Murashige & Skoog
MTA	5'-methylthioadenosine
PCR	Polymerase chain reaction
PMP	PETAL MOVEMENT-RELATED PROTEIN
qRT-PCR	Real-time polymerase chain reaction
<i>RAD</i>	<i>RADIALIS</i>
<i>RBE</i>	<i>RABBIT EARS</i>
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SAM	S-adenosyl-L-methionine
SE	Standard error
SRDX	SUPERMAN repressive domain X
TCP	TEOSINTE BRANCHED 1, CYCLOIDEA and PROLIFERATING CELL FACTORS
VP16	Virion protein 16
WT	Wild type



第一章 前言



1.1 花朵的對稱性及其在被子植物演化的重要性

植物發育過程中，為了適應環境並有效吸引傳粉者以達成繁衍之重要目的，花朵豐富的多樣性便是植物演化的一大關鍵要素，如花型、花器大小、氣味、花色及花斑的分佈等性狀，皆與花朵對傳粉者的吸引力息息相關，並影響植物傳粉和繁殖成功率。而於植物花型發育的分類中，花朵的對稱性便是值得矚目的一大性狀，其中，兩側對稱花被認為是目前被子植物主要的演化趨勢，不同於每一片花瓣皆具有同樣的形狀而規則分佈的輻射對稱花，兩側對稱花的背側、腹側及兩側花瓣會沿單一對稱軸，向兩側呈鏡面對稱分佈，由於其花型固定方向性的限制，提供花朵及傳粉者間專一性的交互作用，使正確傳粉者得以自特定的角度進入花朵當中，進而促使更為精確的花粉傳播和柱頭接收，提升傳粉效率；反之，輻射對稱花則具有複數對稱軸，其花型使得傳粉者可由任意角度進入花朵中，並可能使花粉沾黏至傳粉者不正確的位置，導致傳粉效率較低。由於兩側對稱性花型所具有的這些特徵，花朵與傳粉者間專一的交互作用得以共演化 (co-evolution)，進而產生生殖隔離，並使花朵的繁殖成功率大幅提升，成為一優勢演化性狀 (Hileman, 2014; Sargent, 2004; Spencer & Kim, 2018)。

1.2 花朵對稱性建立的調控機制 (*CYC-RAD-DIV*)

1.2.1 *CYCLOIDEA* (*CYC*) 屬於 TCP 轉錄因子家族 Class II 基因

花朵兩側對稱性的建立已知主要由一關鍵基因——*CYCLOIDEA* (*CYC*) 參與調控建立，其為 TCP 轉錄因子家族的一員，並屬於 ECE-CYC2 的分群中。

TCP 轉錄因子家族的命名來自於玉米 (*Zea mays*) 的 *TEOSINTE BRANCHED1* (*TB1*)、金魚草 (*Antirrhinum majus*) 的 *CYCLOIDEA* (*CYC*) 及水稻 (*Oryza sativa*) 的 *PROLIFERATING CELL FACTORS 1&2* (*PCF1 & PCF2*)，此轉錄因子家族的編碼蛋白質上具有 basic helix-loop-helix motif (bHLH)，並可因 TCP 結構域的不同，進而劃分成含 PCF 蛋白的 TCP class I、以及含 TB1 與 CYC 蛋白的 TCP class II。又在 TCP 結構域以外的序列上，可在一些 TCP class II 的蛋白中發現具有 18-20 殘基的 arginine-rich motif (R domain)，而在大部分的 TCP class I 上皆缺乏。TCP class II 又可進一步分為 CYC/TB1 (ECE) 及 CIN 兩個類群，ECE 類群基因在 TCP 與 R 功能域之間可發現 Glutamic acid-cysteine-glutamic acid motif，並因不同的基因重複細分成 CYC1、CYC2 及 CYC3，而 CYC2 類群的基因被認為是參與花朵對稱性調控的主要成員 (Martín-Trillo & Cubas, 2010)。

1.2.2 金魚草 (*Antirrhinum majus*) 調控花朵對稱性的 *CYC-RAD-DIV* 網絡

金魚草調控花朵兩側對稱性的 *CYC-RAD-DIV* 機制已被廣泛研究，*CYC* 與其相近蛋白 *DICHOTOMA* (*AmDICH*) 局限於背側花瓣高度表現，並透過促進 *RADIALIS* (*AmRAD*)，使其和腹側表現基因 *DIVARIVATA* (*AmDIV*) 競爭與 *DIV-and-RAD-interacting-factors* (DRIFs) 的交互作用，而 *AmDIV* 與 DRIFs 的交互作用可活化使腹側花瓣性狀發育的基因，因此，由於 *CYC* 在背側花瓣的高度表現，便可進而抑制 *AmDIV* 所調控的腹側性狀發育，透過調節細胞增殖及細胞延長的作用，促使背側花瓣生長出不同於腹側花瓣的獨特形狀、大小等性狀，且同時抑制雄蕊的發育，因此得以建立花朵的兩側對稱性 (Spencer & Kim, 2018)。在金魚草 *cyc;dich* 雙突變株中，因背側花瓣中 *AmDIV* 的表現並未被抑制，進而使背側花瓣腹側化，生長成輻射對稱花；此外，金魚草的 *cyc* 單突變株及 *dich*

單突變株皆僅發現背側花瓣形狀改變，而 *cyc* 突變株可觀察到較明顯的形態差異，顯示 *CYC* 的效益較大，且對花瓣的形狀、大小等性狀有明顯調控作用，應為花朵對稱性建立的主導者 (Corley et al., 2005; Luo et al., 1999)。



1.2.3 *CYC-RAD-DIV* 在所有被子植物物種中並不保守

然而，此 *CYC-RAD-DIV* 機制並非在所有被子植物物種中皆保守，如阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*) 部分 *RAD*-like 基因不像金魚草 *AmRAD* 基因局限於背側花瓣表現，而在阿拉伯芥過度表現金魚草 *CYC* 基因亦不會提升這些 *RAD*-like 基因的表現 (Baxter et al., 2007; Costa et al., 2005)；非洲堇 (*Saintpaulia ionantha*) *RAD*-like 基因與 *DIV*-like 基因在不同輻射對稱花品系亦與 *CYC*-like 基因的表現模式不符 (Hsu et al., 2018)；而具有輻射對稱花的美洲地筍 (*Lycopus americanus*) *CYC*-like 基因有著背側高表現，但 *RAD*-like 基因則並無此背側局限表現 (Zhong et al., 2017)；歐洲千里光 (*Senecio vulgaris*) 的 *SvDIV1B* 會抑制 *RAY3* (*CYC*-like 基因) 和 *SvRAD*，並會活化 *RAY2* (另一 *CYC*-like 基因) (Garcês et al., 2016)，顯示在演化過程中，這些基因可能產生改變，使得花朵對稱性的調控並不總是遵循 *CYC-RAD-DIV* 機制，而這些基因的交互作用及上下游關係也並不一定固定不變 (Spencer & Kim, 2018)。此外，過去文獻亦曾發現有別於 *CYC-RAD-DIV* 的機制可調控花朵對稱性，如阿拉伯芥受生長素調控的 C2H2 zinc finger 轉錄因子 *RABBIT EARS* (*RBE*)，其突變時會有兩片花瓣無法延長進而產生兩側對稱花，而此可能透過 *RBE* 可負調控 *TCP4* 所致 (Lampugnani et al., 2013; Li et al., 2016; Spencer & Kim, 2018; Takeda et al., 2004)。花朵對稱性的建立包含大量不同形態特徵差異，如背腹側花瓣大小差異、細胞大小及細胞數目差異、花色及花斑、雄蕊發育等性狀，如此龐大的形態差異應並非僅由 *CYC-RAD-DIV* 單一機制來調控，而仍具有其他的下游基因或調控路徑參與，並共同合作以完成花

朵發育過程繁複且細微的形態差異，進而建立花朵的對稱性。



1.3 大岩桐 (*Sinningia speciosa*) 為研究花朵對稱性的良好植物材料

1.3.1 苦苣苔科 (Gesneriaceae) 具有豐富的花朵多樣性及對稱性反轉

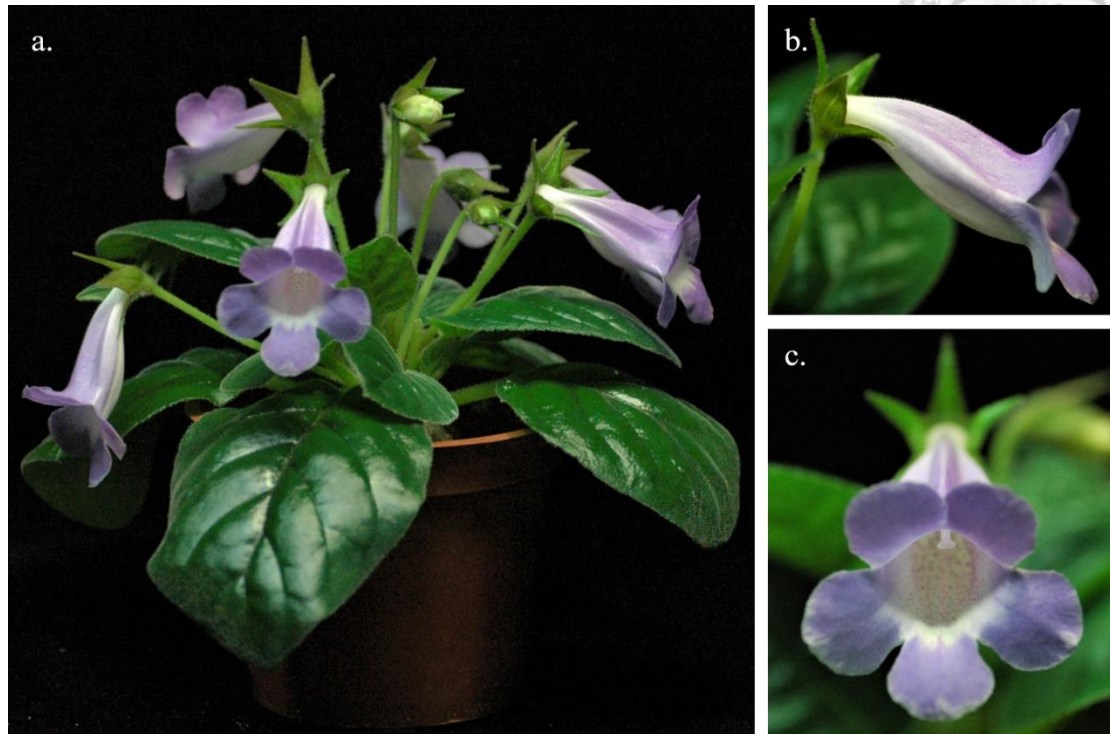
為了找尋潛在的 *CYC* 下游基因，我們須選用適當的植物材料以探討與花朵兩側對稱性建立之系統。其中，唇形目 (Lamiales) 中的苦苣苔科 (Gesneriaceae) 植物多分佈於熱帶與亞熱帶地區，其花朵多為唇形花，而不同具有兩側對稱花的物種皆有多樣的花型、大小及顏色，這與傳粉專一性息息相關。值得注意的是，雖然輻射對稱花多次演化為兩側對稱花，但苦苣苔科的物種演化中，卻有許多物種可見自兩側對稱花又反轉演化為輻射對稱花，且具有許多不同對稱花型、大小、花色及花斑的園藝栽培種，顯示此類群的植物物種花朵對稱性的發育模組，具有很容易改變的特性，值得深入探討其花朵對稱性調控網絡。

1.3.2 大岩桐的花朵發育及背腹側花瓣性狀差異

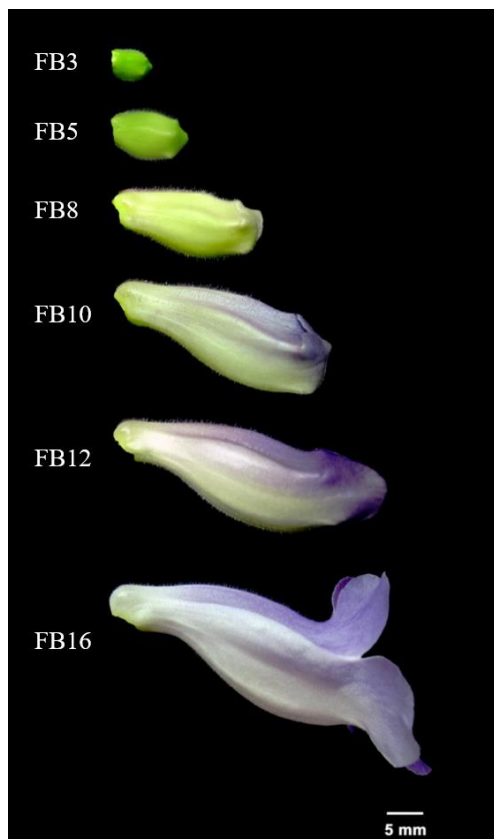
苦苣苔科大岩桐 (*Sinningia speciosa*) 為著名的園藝觀賞植物，因有碩大的花瓣及各種不同鮮艷花色的輻射對稱花而廣受人喜愛。然而，大岩桐擁有具兩側對稱花的野生種，其花瓣沿單一垂直對稱軸而向兩側形成鏡面對稱，相較於花朵碩大的輻射對稱園藝品種，野生種大岩桐的花朵較小，且其背側、兩側及腹側花瓣皆擁有不同大小、曲線、花色及花斑等性狀，而此兩側對稱花野生種及輻射對稱花栽培種的花型差異，被發現正是由 *SsCYC* 基因序列的 10 bp 缺失所導致 (Dong et al., 2018)，使得背側花瓣生長出與兩側、腹側不同的性狀，背側雄蕊的發育亦被抑制，顯示此物種具有可改變花朵對稱性的分子機制，提供適合花朵對

稱性相關研究的實驗材料 (Dong et al., 2018)。我們選用大岩桐 ‘Espirito Santo’ (*Sinningia speciosa* (Lodd.) Hiern ‘Espirito Santo’) 品系 (以下稱大岩桐)，其具有兩側對稱花，除了背側、兩側、腹側花瓣不同的性狀與大小外，更可見不同的花色及專一出現在腹側花瓣的紫色點狀花斑 (圖一 A)。而大岩桐花朵的發育又可以背側花筒不同長度區分為 16 個時期，其中，約可在第 5 期花苞看見較明顯的背腹側花瓣差異出現 (圖一 B、C)。

A.



B.



C.

Stages	Dorsal tube length (mm)
1	< 2
2	2 – 4
3	4 – 6
4	6 – 8
5	8 – 10
6	10 – 12
7	12 – 15
8	15 – 18
9	18 – 21
10	21 – 24
11	24 – 27
12	27 – 30
13	30 – 33
14	33 – 36
15	Pre-anthesis (> 36)
16	Anthesis (> 36)

圖一、大岩桐 ‘Espirito Santo’ 的花朵外觀及花期定義

A、大岩桐的植株 (a) 與成熟盛開花朵之側面 (b) 及正面 (c) 外觀。B、大岩桐花朵的發育過程，Flower bud 3-16 (FB 3-FB 16) 代表花苞發育過程中第 3 時期至第 16 時期 (Pan et al., 2022)。C、大岩桐花朵的發育時期定義，以背側花筒不同長度分為 16 個時期。

1.4 大岩桐背腹側花瓣中具有差異表現的潛在 *SsCYC* 下游基因

1.4.1 *SsCYC* 不僅調控花朵對稱性，亦影響花瓣形狀、大小及花色等性狀

大岩桐花苞發育比較 *SsCYC* 等位基因對花朵對稱性影響及花瓣立體結構，可見背腹側花瓣的差異生長包含背側花瓣基部蜜囊凸起結構 (gibbous)、腹側花瓣向外彎曲及背腹側花瓣不同長度、細胞大小和數目等，顯示 *SsCYC* 不僅調控花朵的對稱性，更進一步影響背腹側花瓣的差異形狀、大小、甚至花色與花斑等性狀 (Pan et al., 2022)。

1.4.2 透過大岩桐 RNA-seq 篩選潛在的 *SsCYC* 下游基因

大岩桐花朵發育約在第 3 期花苞開始建立初期的兩側對稱性狀，並於第 5 期有較明顯的背腹側花瓣性狀差異，而 *SsCYC* 也在第 3 期開始明顯局限高度表現於背側花瓣中，並在第 5 期達到最高表現量，與其花朵兩側對稱性發育相符。此外，本實驗室過去研究亦發現大岩桐具有較大的背側花瓣，且為透過影響花瓣細胞的延長生長調控，顯示大岩桐 *SsCYC* 基因確實參與花朵兩側對稱性的建立 (Pan et al., 2022)。為了找尋 *SsCYC* 潛在的下游基因，透過大岩桐第 5 期背腹側花瓣轉錄體的分析結果，發現了 630 個具有背腹側差異表現的基因，並利用 iTAK 篩選出 34 個背腹側差異表現的轉錄因子。其中，由於 *CYC* 屬於 TCP class II 轉錄因子，於 5' 端啟動子帶有 TCP class II 結合位點的差異表現轉錄因子便很可能是 *SsCYC* 的潛在下游基因，受其調控並參與兩側對稱性的建立。又 *SsCYC* 局限於背側花瓣高度表現，因此我們首先篩選出同樣於背側高表現且帶有 TCP 結合位點的 8 個轉錄因子進一步研究，分別為：*SsRL2*、*SsERF17*、*SsERF3*、*SsOFP6*、*SsCYC*、*SsCIB2*、*SsNGAL1*、*SsERF-1*。其中，值得注意的是在這 8 個差異表現轉錄因子中，就有 3 個屬於乙烯反應因子 (ERF, ethylene

response factor) 的基因——*SsERF-1*、*SsERF3*、*SsERF17*，而許多文獻報導了乙烯及乙烯相關基因對植物生長發育、器官大小等機制的關聯，顯示乙烯相關反應路徑很可能參與調控大岩桐背腹側花瓣的差異性生長及花朵對稱性建立。此外，本實驗室先前研究更在於草原生質體以雙螢光素酶報告基因檢測實驗 (dual luciferase reporter assay) 證實 *SsCYC* 會明顯促進 *SsERF-1* 表現 (王佩琦, 2019)，顯示該基因很可能參與調控大岩桐背腹側花瓣的差異性生長。

1.5 乙烯反應因子 (ERF) 及其對植物發育的調控

1.5.1 ERF 隸屬於 AP2/ERF 轉錄因子家族

乙烯反應因子 (ethylene response factor, ERF) 屬於 APETALA2/ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR (AP2/ERF) 轉錄因子家族成員，是最大的植物轉錄因子家族之一，其帶有保守的 AP2/ERF 結構域，而這群轉錄因子可能受到植物激素乙烯 (ethylene) 的影響而活化，結合並調節啟動子帶有 GCC Box (AGCCGCC) 的下游基因，進而調控許多植物發育過程，如器官生長、發育、激素和逆境反應等機制，包含轉錄及轉錄後調控 (Chandler, 2018; Dietz et al., 2010; Gibbs et al., 2015; Licausi et al., 2013; Mizoi et al., 2012)，而大部分的 AP2/ERF 轉錄因子在正常狀態下表現量較低，並會於特定生長階段或刺激下受到誘導或抑制 (Feng et al., 2005; H. Li et al., 2017; Owji et al., 2017)。

1.5.2 *ERF* 基因對植物營養器官的生長發育扮演重要角色

雖然大部分針對 *ERF* 基因的研究皆著重於其對逆境反應、果實後熟、花瓣衰老的重要性，如小麥 (*Triticum aestivum*) *TaERF3* 過度表現會使幼苗對鹽與乾旱逆境的耐受度顯著增加 (Rong et al., 2014)；玫瑰 (*Rosa hybrid*) 中受乙烯誘導

的 *RhERF 3* 會促使花朵衰老，而 *RhERF113* 則會透過正調控細胞分裂素 (cytokinin) 合成減緩玫瑰花瓣衰老等 (Khaskheli et al., 2018; Luo et al., 2021)。但其對於植物的生長發育亦扮演著相當重要的角色，研究文獻顯示許多 *ERF* 基因亦會透過調控細胞分裂、細胞延長等機制來影響植物營養器官的生長，如阿拉伯芥 *ERF1* 基因 (*AtERF1*) 會經由調控 *ANTHRANILATE SYNTHASE 1* 影響生長素 (auxin) 合成進而抑制初生根的生長，而 *AtERF1* 也同樣會調控莖、葉等器官的發育，並使植株較為矮小 (Dubois et al., 2018; Lorenzo et al., 2003; Mao et al., 2016; Solano et al., 1998)；阿拉伯芥的 *ERF6* (*AtERF6*) 亦會透過抑制細胞分裂和細胞延長來抑制葉片生長 (Dubois et al., 2013)。

1.5.3 *ERF* 基因對植物繁殖器官生長發育及分化的調控

除了營養器官外，亦有一些 *ERF* 基因調控繁殖器官生長的報導。如文心蘭 (*Oncidium Lemon Heart*) 的 *OnERF71* 會透過抑制細胞延長與分裂來抑制花瓣的生長，蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis Sogo Yukidian 'V3'*) 的 *PhaERF25* 則會使植株較晚進入生殖階段，且花朵數目增加，而花瓣、花萼則較短小 (卓暉皓, 2019)。此外，部分 *ERF* 基因亦被發現與繁殖器官的分化有關，如阿拉伯芥 *ERF12* (*AtERF12*) 會調控生殖器官分化，而 *AtERF12* 缺失則會導致多餘萼片生成、花器數量不穩定 (Chandler & Werr, 2020) 等，顯示不同物種許多 *ERF* 轉錄因子確實與植株生長、器官發育息息相關。

1.6 乙烯及乙烯訊息傳導路徑在植物生長發育扮演的角色

1.6.1 乙烯及乙烯訊息傳導路徑為重要的植物激素調控網絡

乙烯為參與調控植物的生長發育、花朵衰老與脫落、果實成熟、逆境反應等

機制的重要植物激素 (Johnson & Ecker, 1998)。乙烯的生合成是以甲硫胺酸 (Methionine) 為原料，並主要以兩個步驟構成，首先，S-adenosyl-L-methionine (SAM) 會透過 ACC synthase (ACS) 被轉化成 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) 與 5'-methylthioadenosine (MTA)，接著，ACC 會再透過 ACC oxidase (ACO) 被氧化成乙烯、二氧化碳及氰化物 (Adams & Yang, 1979; Adams & Yang, 1977; Boller et al., 1979; Hamilton et al., 1991; Ververidis & John, 1991)。而植物體乙烯訊息傳導路徑 (ethylene signaling pathway) 是透過 Ethylene receptor (ETR1 等) 接收乙烯的訊號，透過一連串的基因傳導，活化 Ethylene insensitive 2 (EIN2) 進入細胞核中促進 EIN3/EIN3-like 1 (EIN3/EIL1)，並進一步促進或抑制 *ERF1* 等其他下游 (如其他 ERFs)，以參與植物體內各種生理代謝的調控 (Guo & Ecker, 2004; Ju & Chang, 2015; Wang et al., 2002)。

1.6.2 乙烯的三相反應 (Ethylene Triple Response)

種子在含有乙烯的黑暗環境發芽，會抑制植株下胚軸 (hypocotyl) 與根 (root) 的生長、促進下胚軸的肥大、並會產生頂端勾 (Apical hook) 的結構，此為典型的乙烯三相反應，是幼苗受乙烯反應的特殊性狀。其最早在豌豆發現，而後被廣泛於不同模式物種中驗證並應用 (Merchante & Stepanova, 2017; Neljubow, 1901; Pei et al., 2013)。由於乙烯三相反應的強度會受到暴露乙烯濃度的影響，因此也被認為是檢驗植株對乙烯敏感性的有力方法 (Guzman & Ecker, 1990)。

1.6.3 乙烯及乙烯傳導路徑對植物營養器官的生長發育扮演重要角色

除了在含有乙烯的環境中生長所產生的三相反應外，乙烯的施加亦在許多物種被證實會影響植株葉片的生長，如部分生長較緩慢的早熟禾 (*Poa*) 品系 (*Poa*

annua & *Poa trivialis*) 在施加較高濃度乙烯 (1 $\mu\text{L/L}$) 時會抑制葉片延長，反之，處理較低乙烯濃度 (0.02-0.03 $\mu\text{L/L}$) 卻會促進葉片生長 (Fiorani et al., 2002)；向日葵 (*Helianthus annuus*) 在施加極低濃度乙烯時亦會促進初生葉面積，而施加高濃度乙烯或乙烯前驅物 ACC 則皆會抑制初生葉生長 (Lee & Reid, 1997)。此外，乙烯傳導路徑亦被報導與植株生長有關，如阿拉伯芥中的 EIN2 為乙烯傳導路徑中的重要正調節成員，其會透過抑制細胞延長來調控葉片生長 (Feng et al., 2015)；反之，乙烯受器 *ETR1* 及 *ETHYLENE RESPONSE SENSOR 1* 為乙烯傳導路徑中的負調節成員，其突變株會使植株矮化、且葉片衰老較快 (Qu et al., 2007)。

1.6.4 乙烯及乙烯傳導路徑影響植物繁殖器官的發育及花朵盛開

過去研究顯示乙烯可調控花瓣大小與其細胞分裂、延長等性狀，透過調節微管方向及部分 *EXPANSIN* 家族基因、Xyloglucan endotransglycosylases/hydrolases (XTH) 編碼基因、endo-1,4-beta-D-glucanase (EGase) 編碼基因等，作用於纖維素以改變植物細胞壁的組成，進而控制細胞延長 (Dubois et al., 2018; Pierik et al., 2007)，如非洲菊 (*Gerbera hybrid*) 花瓣施加乙烯後，可透過抑制細胞延長進而抑制花瓣的生長 (Huang et al., 2020)；康乃馨 (*Dianthus caryophyllus* cv White Sim) 切花經乙烯處理後會產生較大的花瓣，且花序鮮重也增加 (Camprubi & Nichols, 1979)。玫瑰受乙烯抑制的 *RhNF-YC9* 會促進花瓣細胞的延長並調節乙烯與吉貝素 (gibberellins, GA) 間的交互作用；而 *PETAL MOVEMENT-RELATED PROTEIN 1* (*RhPMP1*) 為乙烯傳導路徑中 *RhEIN3* 的下游，以乙烯處理後可促使花瓣基部近軸面與遠軸面的不對稱生長，以加速花朵盛開的過程 (Chen et al., 2020; Cheng et al., 2021; Pei et al., 2013)。此外，先前已有相關研究指出有些 TCP 轉錄因子可以調節激素或受其調節，如阿拉伯芥 *TCP5* 過度表現可使花瓣變小，且其可與乙烯合成基因 *ACS* 結合，並發現 *TCP5* 過度表現轉植株與突變株的乙烯生

合成相關基因及部分 *ERF* 基因皆有顯著差異表現，顯示 *TCP5* 很可能與乙烯調控網絡有關 (van Es et al., 2018)，而 *CYC* 對於花朵對稱性的調控網路可能就包含這些激素的參與 (Danisman, 2016; Spencer & Kim, 2018)。



1.7 研究目的

本篇論文研究目的為探討 *SsERF-1* 是否受乙烯調控，以及 *SsERF-1* 對植株生長發育、特別是花瓣大小的功能性研究，以表明該目標基因是否可能參與大岩桐背腹側花瓣的差異性生長及花朵對稱性的建立。為驗證以上假說，首先建立 *SsERF-1* 與模式物種阿拉伯芥 *ERFs* 基因的演化樹，以確立其在 *ERF* 轉錄因子家族的分群與相關基因的親緣關係；其次，檢驗 *SsERF-1* 在大岩桐第 3、5、8 時期花苞背腹側花瓣表現量，以探討其與大岩桐背腹側花瓣差異生長的關聯。而為了檢驗乙烯是否調控大岩桐花朵的生長及 *SsERF-1* 是否參與乙烯調控路徑，首先比較大岩桐處理乙烯前驅物 ACC 後的性狀，並測量處理後不同時間的 *SsERF-1* 表現量，以驗證乙烯對大岩桐花朵生長的效應及目標基因是否受到乙烯調控；接著，更透過建立 *SsERF-1* 的 3 個阿拉伯芥異位表達轉植株 (35S:*SsERF-1*、35S:*SsERF-1*-VP16 及 35S:*SsERF-1*-SRDX)，進行乙烯三相反應檢驗以驗證 *SsERF-1* 是否參與乙烯的接收及敏感性。最後，為了進行 *SsERF-1* 的功能性探討，亦比較測量阿拉伯芥 *SsERF-1* 異位表達轉植株的植株性狀、花瓣面積大小與花瓣細胞大小，以探究 *SsERF-1* 對植株生長發育的影響。

第二章 材料與方法



2.1 研究材料與生長條件

本實驗所使用的大岩桐栽培種 (*Sinningia Speciosa* ‘Espirito Santo’) 具有兩側對稱花朵，來自於臺灣屏東的辜嚴倬雲植物保種中心 (Dr. Cecilia Koo Botanic Conservation Center, KBCC)。將種子播種於培養土 (泥炭土：蛭石：珍珠石 = 2:1:1) 並置 24°C 恆溫走入式生長箱栽培，每日 16 小時光照 / 8 小時黑暗，濕度約 70 %。大岩桐為多年生塊莖花卉，用於本實驗的大岩桐皆為經較長時間栽培、具有膨大塊莖的植株，其可生長出較健康且性狀穩定的花朵。大岩桐花苞的發育階段定義，自花芽生長至花朵凋亡以背側花筒長度分為 16 個時期。第 5 期 (背側花筒約 8-10 mm) 花苞用於分離目標基因及荷爾蒙處理實驗；第 3 期 (背側花筒約 4-6 mm)、第 5 期、第 8 期 (背側花筒約 15-18 mm) 花苞之背、腹側花瓣用於檢測目標基因表現模式。除了荷爾蒙處理的樣品皆置於液態氮中冷凍後保存於 -80 °C。

2.2 ERF 轉錄因子家族親緣關係樹的建立

ERF 轉錄因子家族親緣關係樹的重建採用阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的 *ERF* 基因，因阿拉伯芥為一模式物種，且基因序列及功能等資訊皆相對完整。參照 PlantTFDB (Plant Transcription Factor Database, <http://planttfdb.gao-lab.org/>) (Jin et al., 2015; Jin et al., 2016; Jin et al., 2014; Tian et al., 2020) ，抓取阿拉伯芥的 122 條 ERF 轉錄因子家族編碼序列 (Coding sequence, CDS)，加入大岩桐的 *SsERF-1*，在 MEGA v.11 (Tamura et al., 2021) 中使用 MUSCLE 進行排序，而後利用貝氏推論 (Bayesian inference, BI) 及最大概似估計 (Maximum likelihood, ML) 統計法以 PhyML 3.0 (Guindon et al., 2010) 建樹，BI 與 ML 親緣關係樹分

支的統計支持度分別透過 Bayesian-like transformation of the aLRT (aBayes) 與 Approximate likelihood ratio test (aLRT) 來評估，統計採樣重複 1000 次並以百分比 (%) 表示 (Bootstrap)。建立好之親緣關係樹以線上工具 iTOL v6 整理呈現 (Letunic & Bork, 2007)。序列上保守的結構域經 MEGA v.11 排序後以 Bioedit v7.2.5 (Hall, 1999) 呈現。

2.3 大岩桐總體 RNA 萃取及反轉錄

將大岩桐第 3 期、第 5 期、第 8 期花苞去除萼片、雄蕊及心皮後，沿腹側、兩側、腹側花筒間稜線切開並收取背側及腹側花瓣，其總體 RNA 的萃取使用 TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)，參照製造商的指南操作並保存於 -80 °C。RNA 的品質及濃度利用超微量分光光度計 (NanoDrop Spectrophotometer) 測量計算，並以膠體電泳確認核糖體 RNA 28S、18S 及 5S 條帶亮度且清晰與否。cDNA 的合成使用 M-MLV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)，按照製造商的指南操作並保存於 -20 °C。

2.4 即時聚合酶連鎖反應 (Real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)

大岩桐第 3 期、第 5 期及第 8 期花苞中目標基因 *SsERF-1* 分別在背腹側花瓣的表現量，以及大岩桐花苞經荷爾蒙處理後 *SsERF-1* 在花瓣中的表現量，利用即時聚合酶連鎖反應 (Real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 來檢驗。qRT-PCR 實驗使用 KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X) Kit (KAPA Biosystem, KR0389)，並以 Bio-Rad PCR Machine (CFX-96) 進行，操作配方及實驗方案如下：



qRT-PCR Mixture

Reagent	Volume
ddH ₂ O	1.0 µL
2X Master Mix	5.0 µL
Forward Primer (1 µM)	1.0 µL
Reverse Primer (1 µM)	1.0 µL
cDNA (5ng/µL)	2.0 µL
Total Volume	10 µL

Thermal Cycle Program

Step	Temperature	Time
1	95 °C	3 min
2	95 °C	10 s
3	55 °C	30 s
	Plate read	
4	Go to step 2, 39 cycles	
5	95 °C	10 s
6	Melt curve 65-95 °C, increment 0.5	5 s
	Plate read	

完成 qRT-PCR 程序後，利用 CFX MaestroTM Software for CFX-Real-Time PCR Instruments (Version 1.1; Bio-Rad Laboratories Inc, 2017) 分析結果資料。

檢驗 *SsERF-I* 在大岩桐花苞不同時期之背腹側表現量實驗中，分別以 3 朵花之背腹側花瓣為單位作為一生物性重複，檢驗含三個生物性重複與三個技術性

重複，以管家基因 (housekeeping gene) *SsACT7* 進行相對倍數量化 (引子序列見附錄表三)，並以腹側花瓣中的表現量作為統一基準 ($2^{-\Delta\Delta CT}$)。 ΔCT 由 Ct (背側或腹側) – Ct (管家基因) 計算而得， $\Delta\Delta CT$ 則由 ΔCT (背側) – ΔCT (腹側) 計算而得。大岩桐進行荷爾蒙處理後檢驗 *SsERF-1* 表現量實驗中，以處理後單朵花之整輪花冠筒作為一生物性重複，檢驗含三個生物性重複與三個技術性重複，以管家基因 *SsACT7* 進行相對倍數量化，並以處理後 1 小時之 ddH₂O 控制組作為統一基準 ($2^{-\Delta\Delta CT}$)。 ΔCT 由 Ct (ACC 處理或 ddH₂O 處理) – Ct (管家基因) 計算而得， $\Delta\Delta CT$ 則由 ΔCT (ACC 處理) – ΔCT (ddH₂O 處理後 1 小時) 計算而得。

2.5 大岩桐花苞的荷爾蒙處理

參照文獻條件配製 0.1 mM ACC (Sigma, Italy) 溶液與控制組 ddH₂O 置於試管中 (Ali et al., 2012; Huang et al., 2020; Trivellini et al., 2011)，每管溶液約 12.5 mL，將管口以封口膜 (Parafilm) 封口以避免溶液蒸散，並於封口膜中央戳一小洞以使花梗穿過。將大岩桐第 5 期花苞連同花梗一同剪下，並留花梗長度約 5 cm，將花梗插入上述 0.1 mM ACC 溶液及控制組 ddH₂O 中，置於 24 °C 恆溫走入式生長箱，每日 16 小時光照 / 8 小時黑暗，濕度控制在 70 % 左右。以 0.1 mM ACC 溶液處理之花苞於處理 24 小時後換至 ddH₂O，並每日記錄花苞背側花筒長度、花苞寬度等性狀，兩種處理的花苞數各為 10 朵。

2.6 大岩桐花苞的透明法 (Clearing Method) 及細胞面積計算

將經荷爾蒙及控制組 ddH₂O 處理 2 天的大岩桐花苞以鑷子去除萼片、雄蕊及心皮後，沿腹側、兩側、腹側花筒間稜線切開，收取背側及腹側花瓣並分別將不同花瓣切成兩半，而後放入 FAA 固定液 (50 % 酒精、5 % glacial acetic acid、

3.7% formaldehyde) 中，每次抽真空至 45 mmHg 約 15 分鐘，反覆至溶液完全進入花瓣中，並置於 4°C 至少 1 夜保存。參照文獻條件配製 Clearing Solution (2.5 mL glycerol、20 g chloral hydrate、7.5 mL ddH₂O) (Kong et al., 2015; Wilkinson & Tucker, 2017)，吸取 20 μ L 溶液並平鋪於載玻片上，將已固定之大岩桐花瓣置於溶液中並蓋上蓋玻片，靜置 24-48 小時，於一週內以複式顯微鏡 (OLYMPUS BX51) 完成拍照觀察，將大岩桐花瓣分成花筒基部 (proximal tube)、中段 (middle tube)、遠端 (distal tube) 以及裂片 (lobe) 四區，分別以顯微鏡拍照記錄。大岩桐花瓣細胞照片以 ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>) 計算花瓣細胞大小，不同部位計算之細胞數量不同，約為 200-700個。

2.7 大岩桐 *SsERF-I* 分離及阿拉伯芥異位表達轉殖載體的構築

利用過去已分離出的部分 *SsERF-I* 編碼序列 (coding sequence, CDS) (王佩琦, 2019) 與實驗室建構之大岩桐第 5 期花苞轉錄體資料進行序列比對以取得 CDS 全長，以大岩桐第 5 期花苞 cDNA 進行 PCR，使用 Phusion[®] High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)，而後電泳並進行膠體純化 (Viogene, GP1002)，參照製造商的指南操作後定序並保存於 -20°C。PCR 的操作配方及實驗方案如下：



PCR Mixture

Reagent	Volume
ddH ₂ O	Up to 10 μ L
5X Phusion TM HF Buffer	2.0 μ L
10 mM dNTPs	0.2 μ L
Forward Primer (10 μ M)	0.5 μ L
Reverse Primer (10 μ M)	0.5 μ L
cDNA (50 ng/ μ L)	1.0 μ L (50 ng)
Total Volume	10 μL

Thermal Cycle Program

Step	Temperature	Time
Initial	98 °C	30 s
Denaturation	98 °C	10 s
	55 °C	30 s
30 Cycles	72 °C	30 s
	72 °C	10 min
Final Extension	16 °C	
Hold		

SsERF-1 的阿拉伯芥異位表達轉殖所使用的 3 個載體 pEpyon-22K (35S)、pEpyon-2aK (35S:SRDX) 及 pEpyon-2bK (35S:VP16) 來自於國立中興大學生物科技學研究所楊長賢老師實驗室 (載體圖譜見附錄圖二、三、四)，其中 pEpyon-22K 帶有 35S 啟動子可使目標基因大量表現；而 pEpyon-2aK 除了 35S 啟動子外還帶有 SRDX 抑制子序列，可使目標基因大量表現並抑制其下游基因的表

現。反之，pEpyon-2bK 帶有 VP16 活化子序列，可使目標基因大量表現並促進其下游基因的表現。將目標基因 *SsERF-1* CDS 透過帶有 PstI 及 BamHI 限制酶切位的引子進行 Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase PCR 擴增（含切位之引子序列見附錄表二），電泳後進行膠體純化並測定濃度。以 PstI 及 BamHI 限制酶 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 裁切擴增之 *SsERF-1* CDS 產物及 pEpyon-22K、pEpyon-2aK、pEpyon-2bK 三個載體，並進行 PCR 產物純化 (Viogene, GP1002)，參照製造商的指南操作後測定濃度，操作配方及實驗方案如下：

Recipe for PstI and BamHI double digestion

Reagent	Volume
Insert/Vector	800-1000 ng
G Buffer	3.0 µL
PstI (10 U)	1.0 µL
BamHI (10 U)	1.0 µL
ddH ₂ O	Up to 30 µL
Total Volume	30 µL

Incubate at 37 °C for 1-2 hr

將反應完成後的產物與未裁切的載體及 *SsERF-1* 同時進行電泳，比較條帶大小以確認產物存在，而後進行 PCR 產物純化並測定濃度。將完成裁切的 *SsERF-1* CDS 分別連接至 pEpyon-22K、pEpyon-2aK、pEpyon-2bK 三個載體，使用 T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)，操作配方及實驗方案如下：

Ligation reaction of vectors with *SsERF-1* digestion product



Reagent	Volume
5X Ligase Reaction Buffer	2.0 μ L
Vector: <i>SsERF-1</i> Molar Ratio	1:3
Vector fragment end conc.	3-30 fmol
<i>SsERF-1</i> fragment end conc.	9-90 fmol
T4 DNA Ligase	1.0 μ L
ddH ₂ O	Up to 20 μ L
Total Volume	20 μ L

Incubate at 22 °C for 1 hr, and heat inactivate at 65 °C for 10 min

將反應完成的產物分別取 10 μ L 加至 100 μ L 勝任細胞 *Escherichia coli* HIT-DH5 α (Real Biotech Corporation, Taipei, Taiwan) 中，並以熱休克處理 (heat shock) 使連接完畢的載體得以轉型至勝任細胞中，熱休克處理的操作步驟如下：

Heat shock method

Step	Time
On ice	20 min
Incubate at 42 °C	1 min
On ice	5 min

將完成熱休克處理的菌液分別加入 500 μ L LB 液態培養基後於 37 °C 震盪培養 1 小時，而後以 13000 rpm 離心 1 分鐘並去除部分上清，懸浮殘留菌液後以塗抹法分別接種至含有 Kanamycin (50 μ g/mL) 的 LB 固體培養基上，於

37 °C 培養 16-18 小時。以 Colony PCR 確認菌落含有目標載體後，將成功轉型的菌落接種至 5 ml 含有 Kanamycin (50 µg/mL) 的 LB 液態培養基，於 37 °C 震盪培養 16-18 小時，並使用 Mini Plus Plasmid DNA Extraction System Kit (Viogene, GMV2002) 進行質體抽取，參照製造商的指南操作後測定濃度並定序，而後保存於 -20 °C。

2.8 農桿菌勝任細胞製備與轉型作用

將農桿菌菌株 EHA105 品系接種於含有 Rifampicin (100 µg/mL) 的 LB 固體培養基上，於 28 °C 培養 2-3 天後，挑取菌落接種至 2 mL 含有 Rifampicin (100 µg/mL) 的 LB 液態培養基，於 28 °C 震盪培養 12-16 小時至 OD₆₀₀ = 1.0，而後取 1 mL 的新鮮農桿菌液加至 50 mL 含有 Rifampicin (100 µg/mL) 的 LB 液態培養基，於 28 °C 震盪培養 6 小時至 OD₆₀₀ = 0.8-1.0。將菌液置於冰上 10-15 分鐘後，分裝至 50 mL 離心管中，於 4 °C 8000 rpm 離心 5 分鐘後去除上清液，重複離心至所有菌液的菌體沉澱物皆收集至同一離心管中，以 5 mL 的冰 ddH₂O 懸浮並清洗菌體沉澱物，於 4 °C 6000 rpm 離心 5 分鐘後去除上清液。將菌體沉澱物以 0.5 mL 的冰 20 mM CaCl₂ 溶液懸浮，而後以每管 0.1 mL 農桿菌液分裝至 1.5 mL 微量離心管並置於冰上，是為勝任細胞。

將 1 µg 的重組質體 DNA 分別加至已分裝農桿菌勝任細胞中輕輕混合均勻，置於液態氮冷凍 5 分鐘後於 37 °C 水浴培養 5 分鐘。於各管加入 1 mL LB 液態培養基並於 28 °C 震盪培養 1-2 小時，於室溫 4000 rpm 離心 2 分鐘，去除上清液後以 500 µL LB 液態培養基懸浮菌體沉澱物，而後取 20-100 µL 菌液以塗抹法接種至含有 Kanamycin (50 µg/mL) 的 LB 固體培養基，於 28 °C 培養 2-3 天，並以 Colony PCR 確認菌落含有目標載體，即完成轉型作用。

2.9 阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的無菌播種與栽培

野生型阿拉伯芥 Col-0 品系的種子取適量置於 1.5 mL 微量離心管中，以 1 mL 70 % 酒精清洗 1 分鐘後去除，加入 1 mL 消毒液 (將市售消毒水以 ddH₂O 稀釋 4 倍，並加入 Tween-20 至最終濃度約 0.05%)，持續手動搖晃消毒約 7 分鐘，而後於無菌操作台中去除消毒液，並以 ddH₂O 反覆清洗種子至少 4 次，最後一次不需去除 ddH₂O。將 P200 微量吸管尖 (tip) 前端以酒精消毒後的剪刀剪開以使種子可順利通過管口，並以 P20 微量吸管 (pipette) 操作，吸取種子並均勻點至 1/2 MS (Murashige and Skoog Basal Salt Mixture, Sigma, Italy) 培養基 (0.215% MS, 1% agar) 上，置於 4 °C 黑暗中 3 天後，取出並栽培於 22 °C 恆溫生長箱，每日 16 小時光照 / 8 小時黑暗。經過培養約 10-14 天，將幼苗移植至培養土中 (泥炭土 : 蛭石 : 珍珠石 = 9 : 1 : 1)，置於 22 °C 恆溫生長箱栽培，每日 16 小時光照 / 8 小時黑暗。

2.10 阿拉伯芥基因異位表達轉殖

SsERF-1 基因阿拉伯芥異位基因表達乃透過花序浸漬法 (floral dip) 轉殖，參照「Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method」(Zhang et al., 2006)，將帶有 pEpyon-22K (35S:*SsERF-1*)、pEpyon-2aK (35S:*SsERF-1*-SRDX)、pEpyon-2bK (35S:*SsERF-1*-VP16) 三個轉殖載體的重組質體 DNA 的農桿菌落接種至 5 mL 含有 Kanamycin (50 µg/mL) 的 LB 液態培養基，於 28 °C 震盪培養 1-2 天至 OD₆₀₀ = 1.0 並吸取分裝至 1.5 mL 微量離心管中，以 13000 x g 離心 30 秒後去除上清，重複離心至所有菌液的菌體沉澱物皆收集至同一微量離心管。進行實驗操作的阿拉伯芥約為 3-4 週植株，並去除果莢及已開始生成果莢的花。事前製備 Inoculation buffer (1/2 MS, 5% Sucrose)，滅菌後保存於 4 °C，並於進行阿拉伯芥花序浸漬前在無菌操作台中於

15 mL 離心管中製備 Floral dipping buffer，操作配方如下：



Recipe of floral dipping buffer for 1 construct

Reagent	Volume	Final conc.
Inoculation buffer	5 ml	
200 mM Acetosyringone	5 μ L	200 μ M
88 mM BAP	2.5 μ L	44 μ M

以 Floral dipping buffer 分別懸浮已完成離心收集的農桿菌體沉澱物，並將溶液移回原先的 15 mL 離心管，於進行花序浸漬前加入 2.5 μ L Tween-20 並混合均勻，而後以塑膠滴管吸取轉殖溶液並滴在阿拉伯芥花序上，上述製備之 Floral dipping buffer 每管約操作 14 棵植株。完成花序浸漬後將植株橫放於鋪有潮濕擦手紙的塑膠盆中並以保鮮膜包覆維持濕度，置於黑暗隔夜，隔天去除保鮮膜並將植株移至 22 °C 恆溫走入式生長箱正常栽培，每日 16 小時光照 / 8 小時黑暗。1 週後將植株進行第 2 次花序浸漬，重複上述步驟製備溶液及浸漬，本次無需置於黑暗中而直接移回走入式生長箱中正常栽培。待植株生成大量果莢後停止澆水，於果莢乾燥轉褐後收取種子，於室溫保存。

2.11 阿拉伯芥轉植株播種與篩選

阿拉伯芥轉植株的篩選參照「A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation」(Harrison et al., 2006)，將完成花序浸漬的阿拉伯芥植株 T₁ 種子取適量置於 1.5 mL 微量離心管，以 1 mL 70 % 酒精清洗 1 分鐘後去除，加入 1 mL 消毒液 (將市售消毒水以 ddH₂O 稀釋 4 倍，並加入 Tween-20 至最終濃度約 0.05%)，

持續手動搖晃消毒約 7 分鐘，而後於無菌操作台去除消毒液，並以 ddH₂O 反覆清洗種子至少 4 次，最後一次不需去除 ddH₂O。將 P200 微量吸管尖端以酒精消毒剪刀剪開以使種子可順利通過管口，並以 P20 微量吸管操作，吸取種子並均勻點在含有 Kanamycin (50 µg/mL) 的 MS 培養基 (0.43 % MS、1 % agar) 上，置於 4°C 黑暗中 3 天後，取出並置於 22°C 恆溫生長箱，光照 6 小時後黑暗 2 天，而後再以全天光照栽培 3-7 天。將有生成深綠色真葉及完整根系深入培養基的幼苗移植至培養土(泥炭土：蛭石：珍珠石 = 9：1：1)，栽培於 22°C 生長箱，每日 16 小時光照 / 8 小時黑暗。於移植約 1 週後取部分葉片進行 gDNA 粗萃取，並以 PCR 確認篩選轉植株確實帶有轉入目標質體重組 DNA。篩選至阿拉伯芥轉植株 T₂ 時，同時播種野生型阿拉伯芥 Col-0 品系種子並重複上述步驟。

2.12 阿拉伯芥 gDNA 粗萃取

取約 20 mg 阿拉伯芥葉片組織置於 1.5 mL 微量離心管中，將微量離心管稍微浸泡於液態氮冷凍，並以 Blue pestle 將組織磨碎，加入 400 µL Extraction buffer (200 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS) 後再度將微量離心管稍微浸泡於液態氮冷凍，並以 Blue pestle 將組織完全磨碎。於 4°C 13000 x g 離心 2 分鐘後，取上清液約 300 µL 置於新的微量離心管，加入等體積的冰 Isopropanol 並置於冰上培養 30 分鐘，而後於室溫 13000 x g 離心 5 分鐘，去除上清後以 100 µL ddH₂O 回溶沉澱並保存於 -20°C，將 gDNA 粗萃取溶液稀釋 100 倍後即可用於 PCR 檢驗。

2.13 反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)

阿拉伯芥轉植株 *SsERF-1* 的表現量利用反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) 檢驗，取下一片經培養基篩選過的轉植株葉片抽取 RNA，反轉錄後使用 Taq DNA Polymerase 2x Master Mix RED (Ampliqon, A190303) 進行 PCR，參照製造商的指南操作後以電泳確認。PCR 的操作配方及實驗方案如下：

PCR Mixture

Reagent	Volume
ddH ₂ O	Up to 10 µL
Taq 2x Master Mix	5.0 µL
Forward Primer (10 µM)	0.25 µL
Reverse Primer (10 µM)	0.25 µL
cDNA (5 ng/µL)	4 µL (20 ng)
Total Volume	10 µL

Thermal Cycle Program

Step	Temperature	Time
Initial	95 °C	30 s
Denaturation	95 °C	30 s
	55 °C	30 s
30 Cycles	72 °C	30 s
	72 °C	5 min
Final Extension	16 °C	
Hold		



2.14 阿拉伯芥轉殖株的乙烯三相反應檢驗 (Triple Response Assay)

將完成花序浸漬的阿拉伯芥植株 T₂ 種子取適量置於 1.5 mL 微量離心管中，以 1 mL 70 % 酒精清洗 1 分鐘後去除，加入 1 mL 消毒液 (將市售消毒水以 ddH₂O 稀釋 4 倍，並加入 Tween-20 至最終濃度約 0.05%)，持續手動搖晃消毒約 7 分鐘，而後於無菌操作台去除消毒液，並以 ddH₂O 反覆清洗種子至少 4 次，最後一次不需去除 ddH₂O。將 P200 微量吸管尖前端以酒精消毒剪刀剪開以使種子可順利通過管口，並以 P20 微量吸管操作，吸取種子並均勻分別點至含有 Kanamycin (50 µg/mL) 的 MS 培養基 (0.43 % MS、1 % Sucrose、0.8% agar) 以及含有 Kanamycin (50 µg/mL) 與 10 µM ACC 的 MS 培養基上 (Merchante & Stepanova, 2017; Olmedo et al., 2006)，野生型 Col-0 則分別點至 MS 培養基及含有 10 µM ACC 的 MS 培養基上，於 4 °C 中 3 天後，取出並培養於 22 °C 恆溫生長箱，光照 6 小時後黑暗 3 天，將幼苗自培養基輕輕取出，比較野生型與轉殖株、10 µM ACC 處理與否之性狀並拍照記錄，各植株約取 40-60 株幼苗計算。

2.15 阿拉伯芥轉殖株花瓣面積計算及透明法 (Clearing Method)

將阿拉伯芥轉殖株 T₂ 完整盛開花朵的花瓣以鑷子取下後置於解剖顯微鏡 (LEICA S8AP0) 拍照記錄，而後放入 FAA 固定液 (50 % 酒精、5 % glacial acetic acid、3.7 % formaldehyde)，抽真空至 45 mmHg 約 15 分鐘，並置於 4°C 至少一夜保存。配製 Clearing Solution (2.5 ml glycerol、20 g chloral hydrate、7.5 ml ddH₂O)，吸取 20 μ L 溶液並平鋪於載玻片，將已固定之阿拉伯芥花瓣置於溶液並蓋上蓋玻片，靜置 24-48 小時，於一週內以複式顯微鏡 (OLYMPUS BX51) 完成拍照觀察，將阿拉伯芥花瓣分成基部 (proximal) 及遠端 (distal) 兩區，分別以顯微鏡拍照記錄。阿拉伯芥花瓣及花瓣細胞照片以 ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>) 計算花瓣面積及花瓣細胞大小，各植株的花瓣計算數量約為 135-225，花瓣細胞數量約為 60-100 個。

2.16 統計分析

所有數據的統計分析透過 Excel 建立運算表格進行。標準誤 (Standard error, SE) = 標準差 (Standard deviation, σ) / 數量平方根 ($\sqrt{n}$)；以 F-test 評估樣品間之異質性，而後以 T-test 評估顯著差異性，若 P-值 (P-value) < 0.05 則代表數據間具有顯著差異性。

第三章 結果



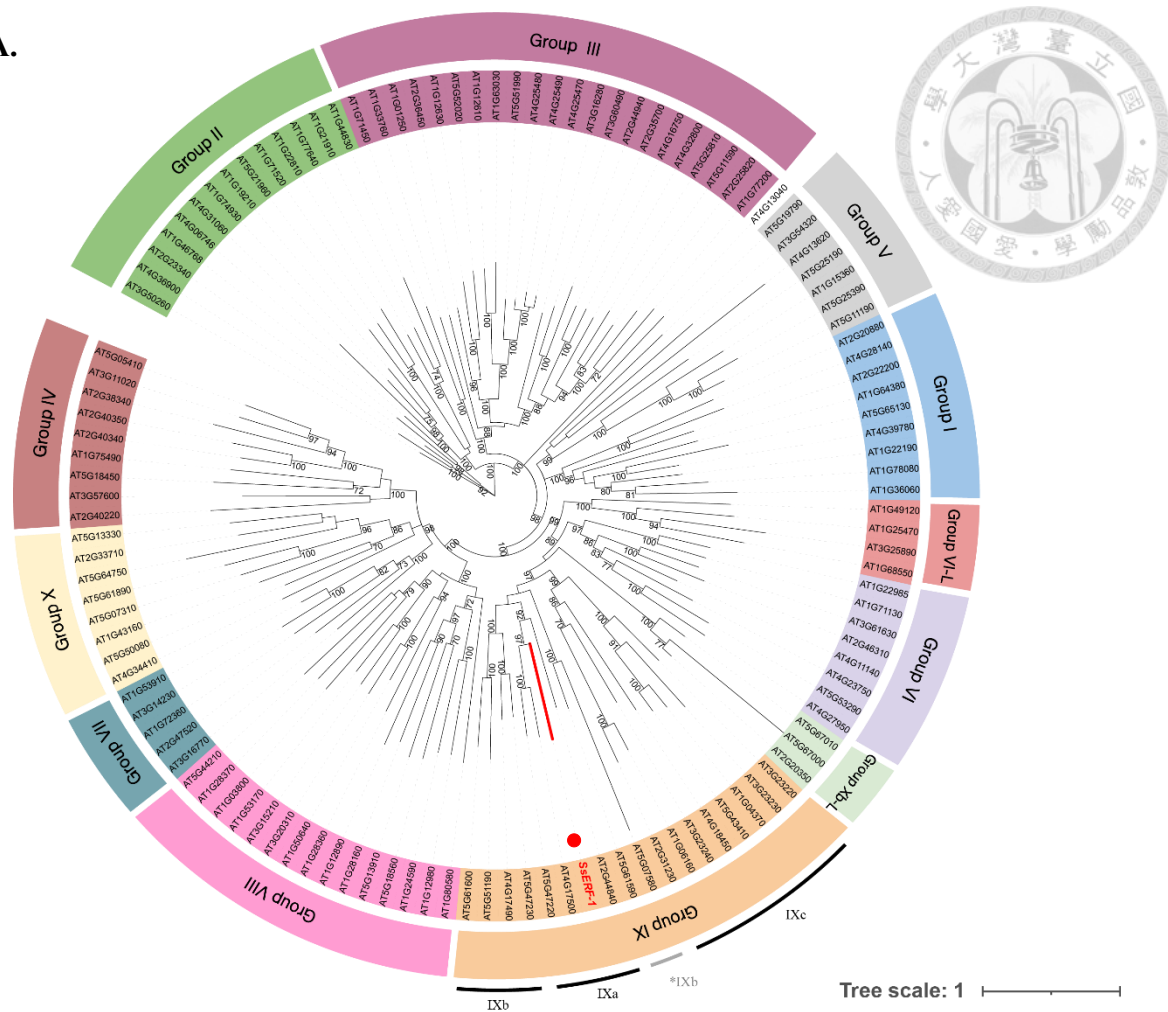
3.1 *SsERF-1* 的親緣關係分析

SsERF-1 全長為 247 個胺基酸，並屬於乙烯反應因子 (ERF) 轉錄因子家族一員。為確立大岩桐 *SsERF-1* 在 ERF 轉錄因子家族中的分群及相關基因的親緣關係，將 *SsERF-1* 與模式物種阿拉伯芥的 122 個 *ERF* 基因的 CDS 全長序列比對後利用貝氏推論 (Bayesian inference, BI) 統計法建立親緣關係樹。參照過往發表阿拉伯芥 ERF 轉錄因子家族親緣關係分析文獻，可見 ERF 轉錄因子家族大約分為 Group I-X 十個主要分群，以及分別與 Group VI、Group X 中的 Xb 子群有著相似基序 (motif) 但 AP2/ERF 結構域 (domain) 並不完整的 Group VI-L (Group VI-Like) 和 Group Xb-L (Group Xb-like) 分支群 (Nakano et al., 2006)，而其中 AT4G13040 則並無分屬至任一分群中 (圖二 A)。由於本次親緣關係分析並無包含外群基因，因此 Group II 類群於親緣關係樹中沒有被分屬至同一個節點，但由最大概似估計 (Maximum likelihood, ML) 統計法所建立之親緣關係樹可見。其應確實分屬至同一分群，並有 Bootstrap value = 82 的統計支持度。而除了 Group X 節點的支持度較低以外 (Bootstrap value = 63)，其他所有分群節點皆具有 Bootstrap value > 97 的高支持度。另外，於 BI 統計法所建立的親緣關係樹中被分屬至 Group V 的 AT4G13620 則在 ML 統計法所建立的親緣關係樹被分屬至 Group VI。

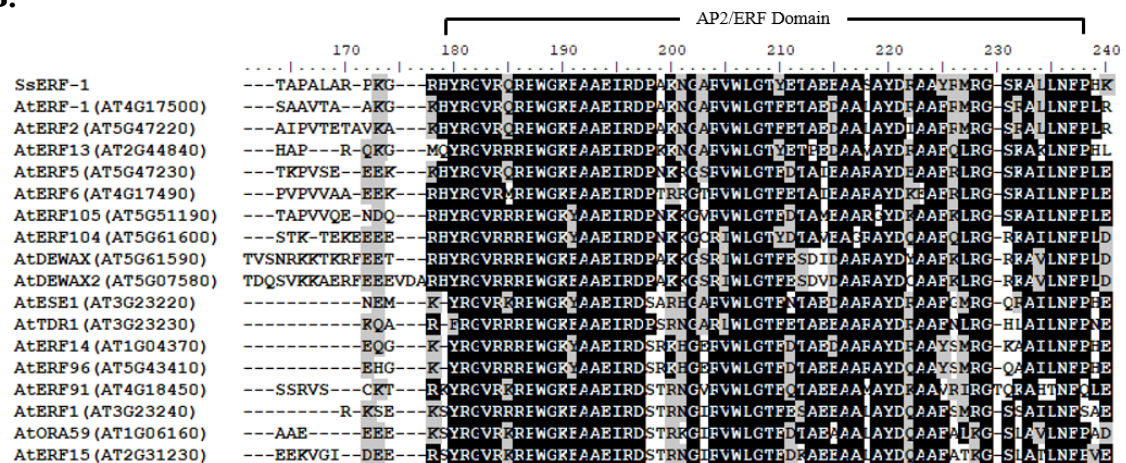
親緣關係樹中 *SsERF-1* 被分屬至 Group IX，序列中段具有保守的 AP2/ERF Domain，此正是 ERF 轉錄因子家族的代表性結構域 (圖二 A、B)。而 Group IX 又依照序列上具有的不同基序被分為 IXa、IXb 及 IXc 三個子群，分別為含 *AtERF-1* (AT4G17500)、*AtERF2* (AT5G44840)、*AtERF13* (AT2G44840) 的 IXa，含 *AtERF5* (AT5G47230)、*AtERF6* (AT4G17490)、*AtERF105* (AT5G51190)、

AtERF104 (AT5G61600)、*AtDEWAX* (AT5G61590)、*AtDEWAX2* (AT5G07580) 的 IXb，以及含 *ATESE1* (AT3G23220)、*AtTDR1* (AT3G23230)、*AtERF14* (AT1G04370)、*AtERF96* (AT5G43410)、*AtERF91* (AT4G18450)、*AtERF1* (AT3G23240)、*AtORA59* (AT1G06160)、*AtERF15* (AT2G31230) 的 IXc (Nakano et al., 2006)。雖然本次親緣關係樹上 *AtDEWAX* (AT5G61590) 與 *AtDEWAX2* (AT5G07580) 並無跟其他 IXb 成員分屬至同一節點下，但 IXa 及 IXc 子群皆分別有同一節點並有高統計支持 (Bootstrap value > 92) (圖二 A)。由親緣關係樹可知 *SsERF-1* 屬於 IXa 子群，並與 *AtERF-1* (AT4G17500) 和 *AtERF2* (At5G44840) 親緣關係最相近，且 IXa 子群序列近 N 端處具有保守的 CMIX-3 Motif (圖二 C)，其為一推定的酸性區 (Putative acidic region) 並被認為可能作為轉錄活化的功能性結構域 (Fujimoto et al., 2000)。

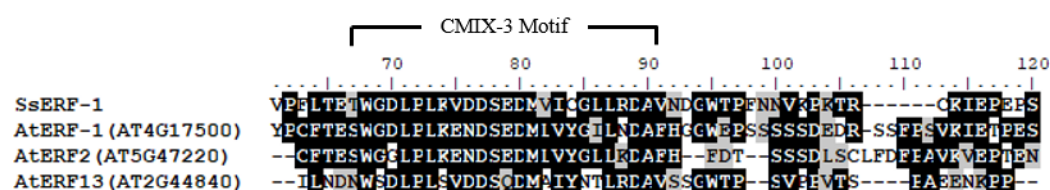
A.



B.



C.



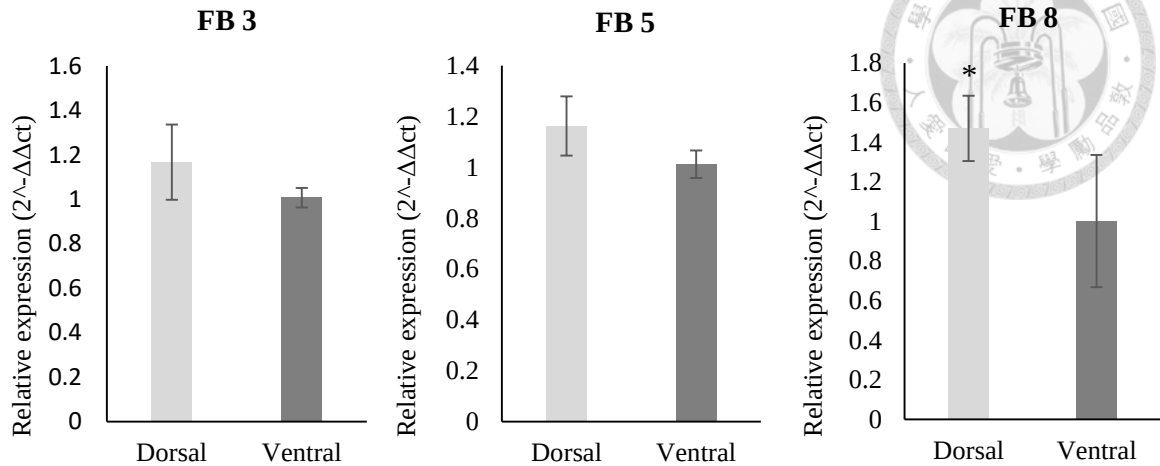
圖二、阿拉伯芥的乙烯反應因子 (ERFs) 與 *SsREF-1* 之基因親緣演化樹

A、使用 122 個阿拉伯芥的 *ERF* 基因與大岩桐 *SsREF-1* 基因，利用貝氏推論 (Bayesian inference, BI) 統計法以 PhyML 3.0 建樹 (Guindon et al., 2010)，統計採樣重複 1000 次以評估分支的支持度 (Bootstrap)，並以 iTOL v6 整理呈現 (Letunic & Bork, 2007)。ERF 轉錄因子家族參照「Genome-Wide Analysis of the ERF Gene Family in Arabidopsis and Rice」分為 Group I~X 十個分支群。黑色底線代表 Group IX 底下的 IXa~IXc 三個子群，灰色底線 (*IXb) 為參考文獻中屬於 IXb 子群但於本親緣演化樹中並無與其他基因分屬於同一節點 (Nakano et al., 2006)。演化樹上各節點之支持度數字僅呈現 Bootstrap > 70。 **B**、阿拉伯芥 Group IX 乙烯反應因子與 *SsREF-1* 序列比對，序列中段具有保守的 AP2/ERF 結構域 (domain)。 **C**、*SsREF-1* 所屬 Group IXa 子群近 N 端保守的 CMIX-3 基序 (motif)。「-」代表序列比對後的間隔，黑底處為序列中胺基酸一致，灰底處為序列中胺基酸相似，基因的命名參照 TAIR (Berardini et al., 2015)。

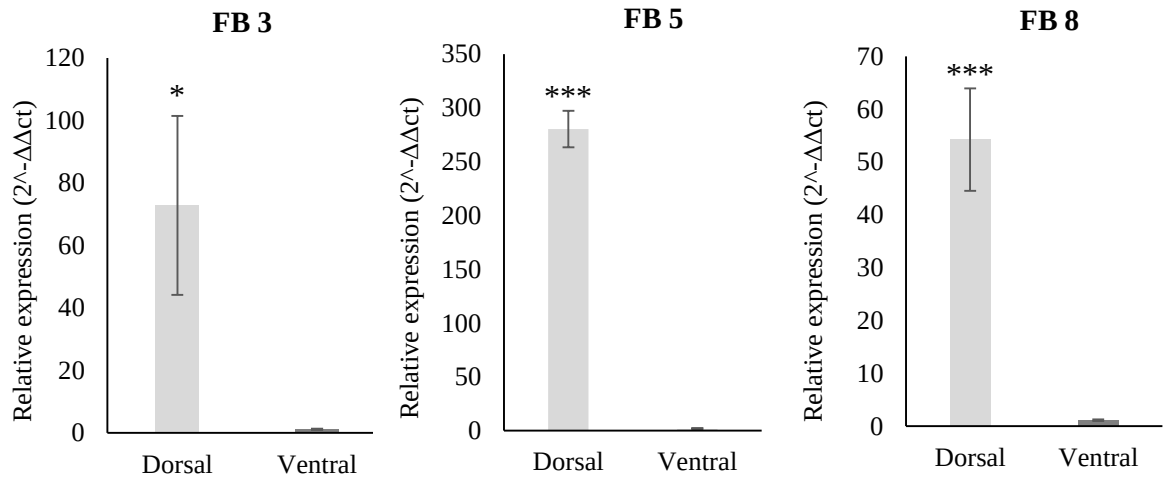
3.2 大岩桐發育過程 *SsERF-1* 在背腹側花瓣的表現

由過去研究發現在大岩桐中，*SsCYC* 同樣是參與調控大岩桐花朵兩側對稱性建立的關鍵基因，且其在花朵較早期的不同生長階段皆具有局限於背側高度表現的特性 (Dong et al., 2018; Pan et al., 2022)。透過大岩桐第 5 期花苞的 RNA-seq 篩選出同樣於背側高表現的目標基因 *SsERF-1*，為了探討該基因是否與 *SsCYC* 同樣在花朵早期發育階段皆有背腹側差異表現的特性，我們利用 qRT-PCR 檢驗大岩桐第 3 期、第 5 期及第 8 期花苞 *SsERF-1* 分別於背腹側花瓣的表現，並與 *SsCYC* 的表現模式進行比較。由結果可得，*SsCYC* 在三個時期皆確實明顯局限於背側花瓣高度表現，且都具有統計顯著差異，與過去已知的研究結果相符 (圖三 B)；而 *SsERF-1* 同樣在三個時期皆於背側花苞具有較高表現，顯示 *SsERF-1* 與 *SsCYC* 有類似的表現模式，然而，在第 3 期及第 5 期花苞中並不具統計顯著差異，僅第 8 期花苞具有顯著差異 (圖三 A)。此外，*SsERF-1* 在背腹側花瓣間的基因表現差異其實並不大，於背側花瓣的表現皆不到腹側花瓣表現量的 2 倍，推測 *SsERF-1* 可能並非參與花朵兩側對稱性建立的主要角色，亦或該基因僅透過少量的表現差異便可調控植株的生長。

A. *SsERF-1*



B. *SsCYC*



圖三、大岩桐第 3、5、8 期花苞 *SsERF-1* 與 *SsCYC* 在背腹側花瓣的表現模式

以 qRT-PCR 檢測大岩桐花苞不同發育時期中 *SsERF-1* (A) 與 *SsCYC* (B) 在背側 (Dorsal) 及腹側 (Ventral) 花瓣中的表現量，由左至右分別為第 3 期花苞 (FB 3)、第 5 期花苞 (FB 5)、第 8 期花苞 (FB 8)。以 *SsACT7* 作為管家基因，並以腹側基因作為基準計算相對表現量 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)。數據以平均值 $\pm$ SE 呈現，圖上的星號代表樣品間之統計差異 (*, $0.01 < P < 0.05$; **, $0.001 < P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)

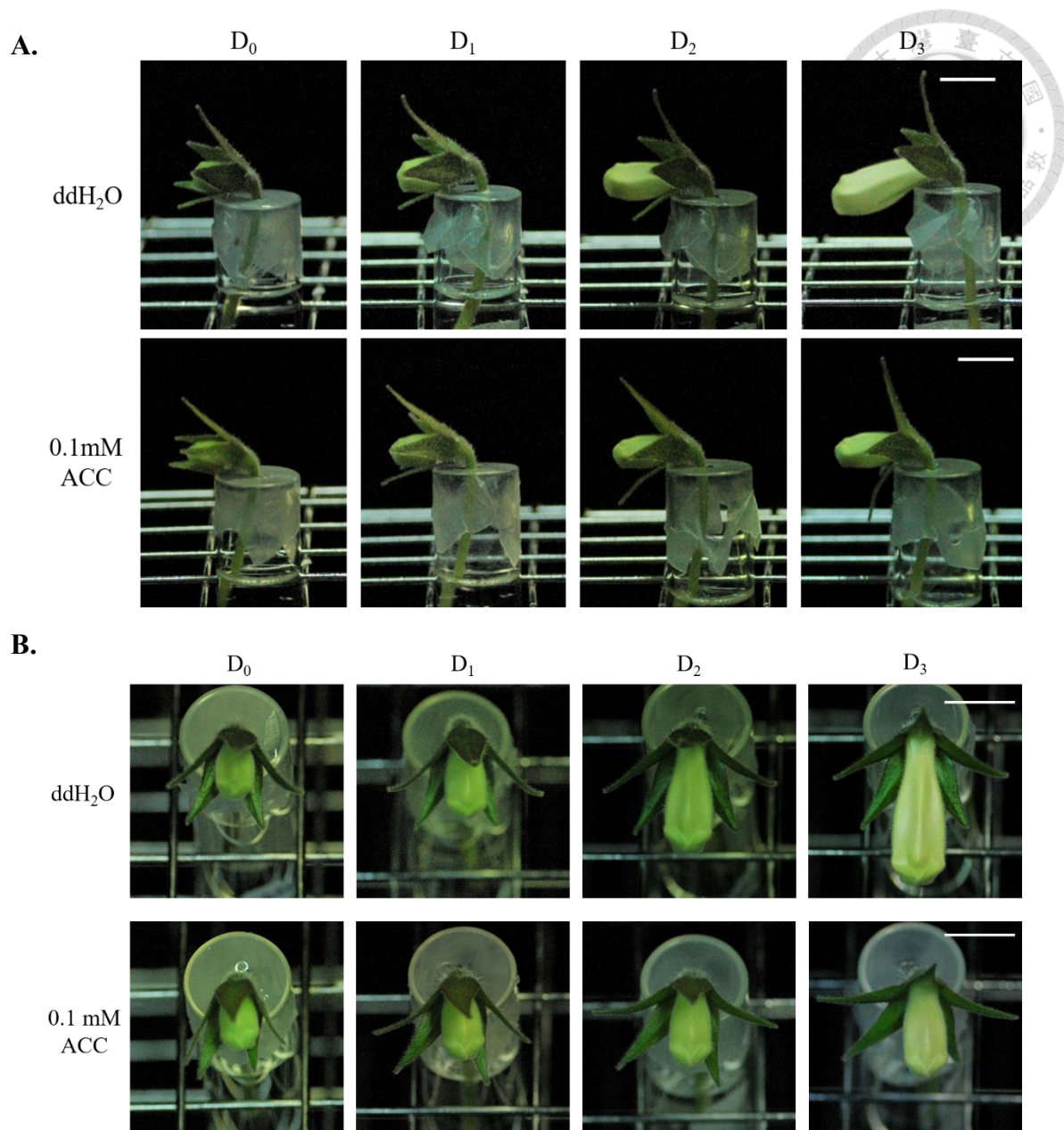
3.3 乙烯前驅物 ACC 處理會透過調控細胞延長來抑制大岩桐花朵的生長

經由過去於大岩桐第 5 期花苞轉錄體分析，發現複數乙烯反應因子皆具有背腹側花瓣差異表現，顯示這群與乙烯相關的基因很可能參與花朵背腹側花瓣的差異性生長，而乙烯更可能為調控花朵發育的重要激素。因此，首先為了確認乙烯是否會影響大岩桐花朵生長，將大岩桐第 5 期花苞進行乙烯前驅物 ACC 溶液處理，並於處理後 3 天內記錄觀察，而由結果可見，0.1 mM ACC 處理組花苞的形狀與控制組並無明顯不同，但大小卻明顯較控制組小 (圖四 A、B)。此外，測量花苞背側花筒的長度及花苞寬度，以 ddH₂O 處理控制組自植株上剪下至處理 3 天的背側花筒長度分別為 8.47 ($\pm$ 0.05)、11.56 ($\pm$ 0.32)、15.27 ($\pm$ 0.69) 及 19.40 ($\pm$ 0.68) cm，而經 0.1 mM ACC 處理花苞背側花筒長度則為 8.33 ($\pm$ 0.05)、10.57 ($\pm$ 0.24)、13.49 ($\pm$ 0.45) 及 14.72 ($\pm$ 0.42) cm，顯示經 ACC 處理的大岩桐花苞長度生長皆明顯較控制組小 (圖五 A)；又控制組處理後 3 天內花苞的寬度分別為 5.05 ($\pm$ 0.06)、5.68 ($\pm$ 0.08)、6.35 ($\pm$ 0.17) 及 7.26 ($\pm$ 0.22) cm，而經 0.1 mM ACC 處理花苞寬度則為 5.05 ($\pm$ 0.10)、5.57 ($\pm$ 0.12)、6.08 ($\pm$ 0.16) 及 6.44 ($\pm$ 0.17) cm，雖然經 ACC 處理的花苞寬度皆較控制組窄，但其於處理後 2 天內並無顯著不同，至第 3 天才具有顯著差異，顯示乙烯對花苞寬度的生長並無明顯的影響 (圖五 B)。綜上所述，乙烯確實會調控大岩桐花苞的生長發育，且對花苞長度的影響效益較大，使其產生較短且較小的花苞。

為了探討乙烯影響大岩桐花瓣大小的生長是經由調控細胞延長或細胞分裂所致，量測 ACC 處理 2 天與控制組的背側及腹側花瓣各部位細胞面積，花瓣自基部至遠端可分為五個部分，分別為背側獨有的基部蜜囊凸起結構 (Gibbous)、以及背腹側花瓣皆具有的花筒基部 (Proximal tube)、花筒中段 (Middle tube)、花筒遠端 (Distal tube)、以及裂片 (Lobe) (圖六)，而由結果可得，以 ddH₂O 處理之控制組背側花瓣基部蜜囊凸起細胞面積為 661.09 ($\pm$ 14.65) μm^2 、花筒基部細

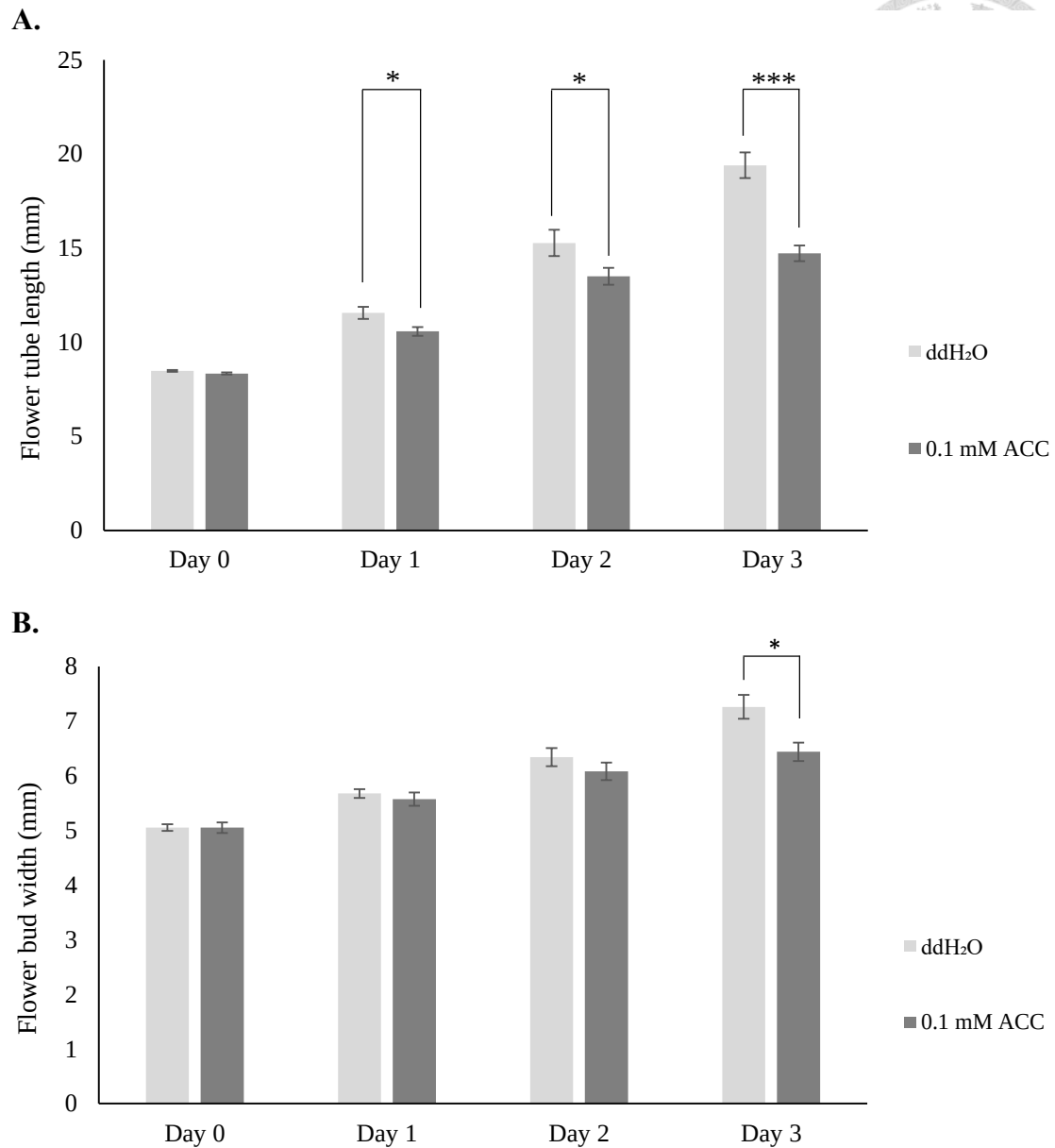
胞為 $918.28 (\pm 24.70) \mu\text{m}^2$ 、花筒中段細胞為 $499.60 (\pm 8.01) \mu\text{m}^2$ 、花筒遠端細胞為 $208.51 (\pm 3.08) \mu\text{m}^2$ 、裂片細胞則為 $266.43 (\pm 4.21) \mu\text{m}^2$ ，而以 0.1 mM ACC 處理 2 天之花苞背側基部蜜囊細胞為 $651.97 (\pm 15.24) \mu\text{m}^2$ 、花筒基部細胞為 $843.06 (\pm 18.84) \mu\text{m}^2$ 、花筒中段細胞為 $333.99 (\pm 3.92) \mu\text{m}^2$ 、花筒遠端為 $140.59 (\pm 1.66) \mu\text{m}^2$ 、裂片細胞則為 $193.60 (\pm 12.90) \mu\text{m}^2$ (圖七 A)，可見除了蜜囊細胞面積並無明顯差異以外，經 ACC 處理之花苞背側不論是花筒各部位或裂片，其細胞面積皆較控制組小，顯示 ACC 的處理會透過抑制細胞延長而使得花瓣較小。

同樣地，腹側花瓣分為四個部分，分別為腹側花筒基部、花筒中段、花筒遠端及裂片， ddH_2O 處理控制組腹側花筒基部細胞為 $778.78 (\pm 14.23) \mu\text{m}^2$ 、花筒中段細胞為 $297.31 (\pm 4.22) \mu\text{m}^2$ 、花筒遠端細胞為 $180.53 (\pm 2.51) \mu\text{m}^2$ 、裂片細胞則為 $277.64 (\pm 3.58) \mu\text{m}^2$ ，而 0.1 mM ACC 處理 2 天腹側花筒基部細胞為 $588.29 (\pm 10.03) \mu\text{m}^2$ 、花筒中段細胞為 $179.79 (\pm 2.33) \mu\text{m}^2$ 、花筒遠端為 $135.86 (\pm 1.72) \mu\text{m}^2$ 、裂片細胞則為 $185.84 (\pm 2.33) \mu\text{m}^2$ (圖七 B)，由結果可見經 ACC 處理花苞腹側花瓣各部位細胞面積皆較控制組小，顯示 ACC 同樣會透過抑制細胞延長並產生較小的腹側花瓣。綜上所述，無論大岩桐花苞之背側或腹側，乙烯皆可經由抑制細胞延長進而調控花瓣生長，使其產生較小的花苞，影響大岩桐花朵發育。



圖四、大岩桐第 5 期花苞經 0.1 mM 乙烯前驅物 ACC 處理後的花苞形態

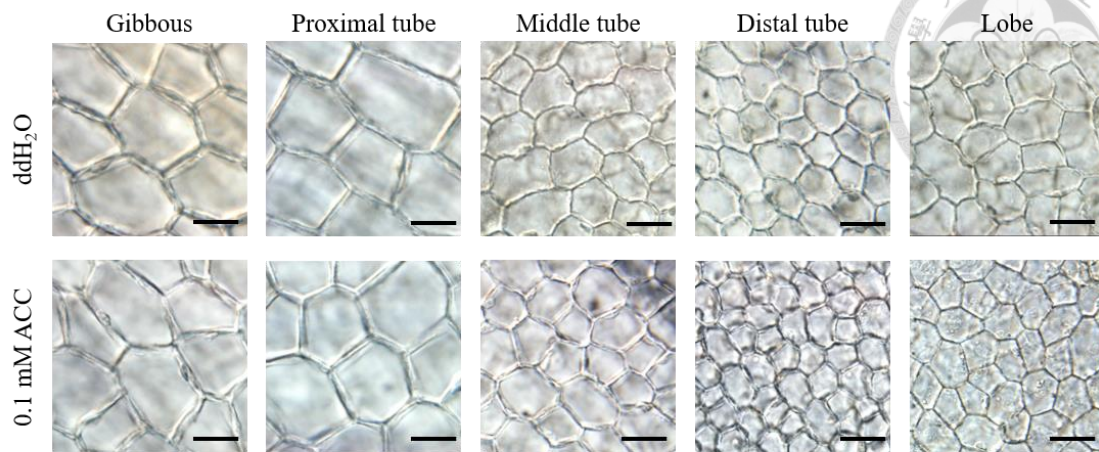
將大岩桐第 5 期花苞瓶插於 0.1 mM ACC 溶液 24 小時，而後更換於 ddH₂O，並與全程瓶插於 ddH₂O 控制組比較之側面照 (A) 與俯瞰圖 (B)。上排為無處理 ddH₂O 控制組，下排為經 0.1 mM ACC 溶液處理實驗組。由左而右分別為剛自植株取下的花苞 (D₀)、瓶插於 0.1 mM ACC 溶液與 ddH₂O 24 小時 (D₁)、將控制組與實驗組換回 ddH₂O 溶液後 1 天 (D₂) 及 2 天 (D₃)。Bar = 1 cm。



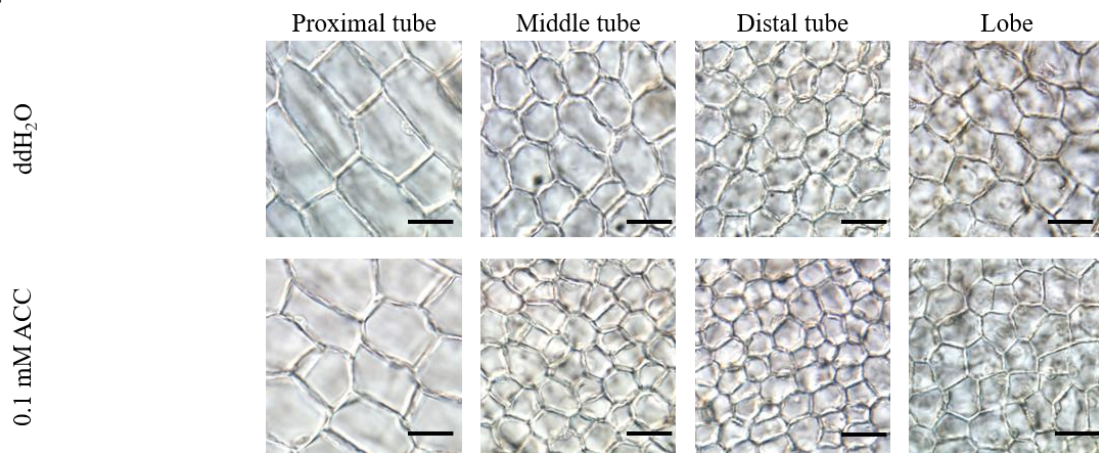
圖五、大岩桐第 5 期花苞經 0.1 mM 乙烯前驅物 ACC 處理後的花筒長度及花苞寬度

將大岩桐第 5 期花苞瓶插於 0.1 mM ACC 溶液 24 小時，而後更換於 ddH₂O，並與全程瓶插於 ddH₂O 控制組比較之背側花筒長度 (A) 及花苞寬度 (B)。由左而右分別為剛自植株取下的花苞 (D₀)、瓶插於 0.1 mM ACC 溶液與 ddH₂O 24 小時、將控制組與實驗組換回 ddH₂O 溶液後 1 天及 2 天。兩種處理花苞數各為 10 朵。數據以平均值 ± SE 呈現，圖上的星號代表樣品間之統計差異 (*, 0.01 < P < 0.05; **, 0.001 < P < 0.01; ***, P < 0.001)。

A.



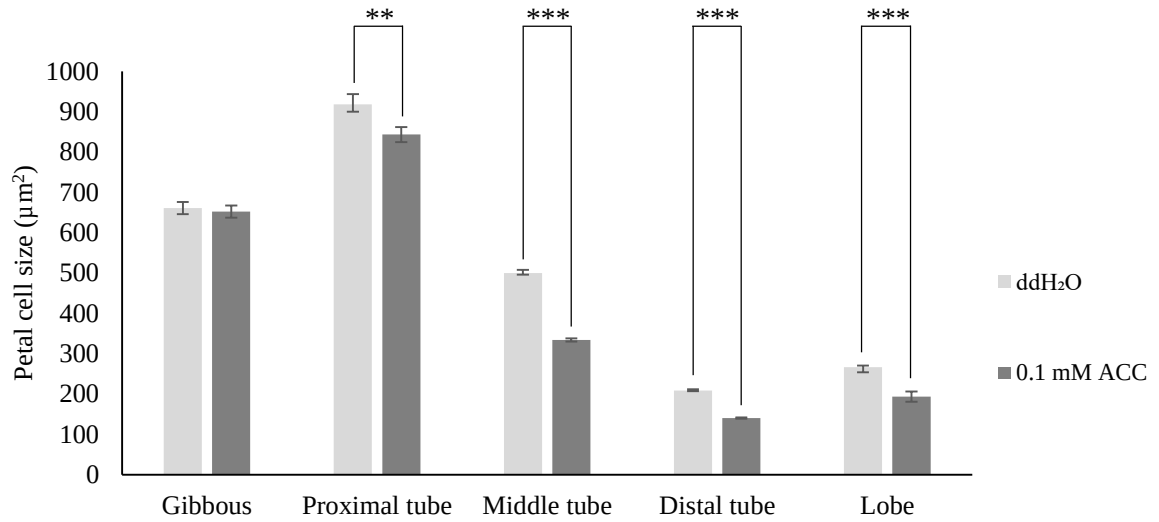
B.



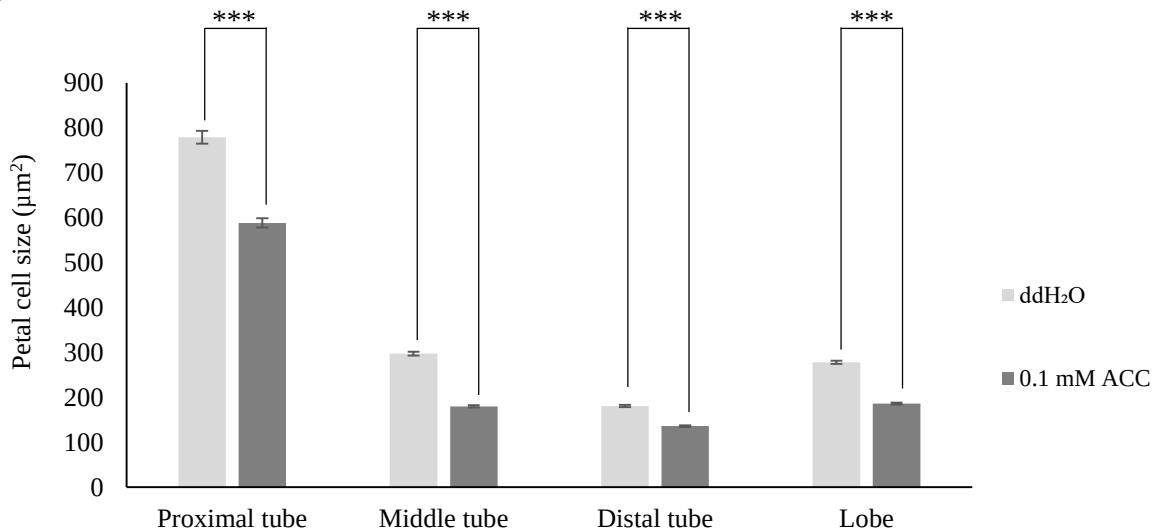
圖六、大岩桐第 5 期花苞經 0.1 mM 乙烯前驅物 ACC 處理後花瓣上表皮細胞形態

將大岩桐第 5 期花苞瓶插於 0.1 mM ACC 溶液 24 小時，而後更換於 ddH₂O 24 小時，並與全程瓶插於 ddH₂O 控制組比較之背側花瓣 (A) 與腹側花瓣 (B) 的上表皮細胞形態。上排為無處理 ddH₂O 控制組，下排為經 0.1 mM ACC 溶液處理實驗組。由左而右分別為僅背側具有的蜜囊凸起結構 (gibbous)，以及花筒基部 (proximal tube)、中段 (middle tube)、遠端 (distal tube) 與裂片 (lobe)。Bar = 20 μ m。

A.



B.

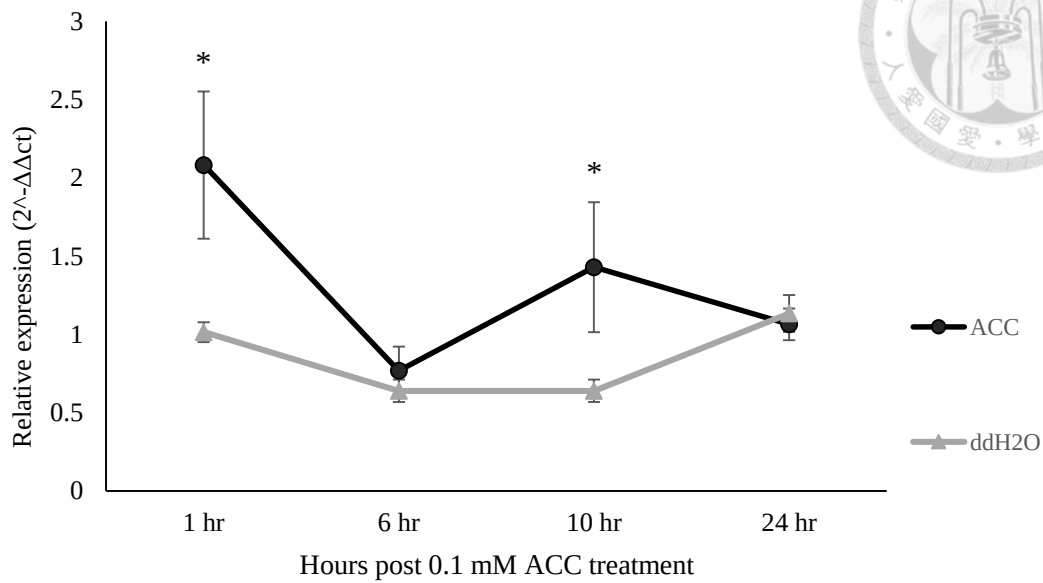


圖七、大岩桐第 5 期花苞經 0.1 mM 乙烯前驅物 ACC 處理後花瓣上表皮細胞面積

將大岩桐第 5 期花苞瓶插於 0.1 mM ACC 溶液 24 小時，而後更換於 ddH₂O 24 小時，並與全程瓶插於 ddH₂O 控制組比較之背側花瓣 (A) 與腹側花瓣 (B) 上表皮細胞面積。不同部位計算細胞數量不同，約為 200-700 個。數據以平均值 ± SE 呈現，圖上的星號代表樣品間之統計差異 (*, 0.01 < P < 0.05; **, 0.001 < P < 0.01; ***, P < 0.001)。

3.4 大岩桐經 ACC 處理後 *SsERF-1* 表現模式

由前述實驗了解乙烯確實會影響大岩桐花苞的生長發育，並抑制花瓣細胞的面積大小後，為了探討本研究之目標基因 *SsERF-1* 表現是否會受到乙烯調控，同樣將第 5 期大岩桐花苞進行 0.1 mM 乙烯前驅物 ACC 溶液處理，並檢驗處理不同時間後花冠筒中 *SsERF-1* 基因表現量，並與全程置於 ddH₂O 控制組比較。由結果可見，經 ACC 處理 1 小時後 *SsERF-1* 表現量約上升至 2 倍，雖上升幅度不大但具有顯著差異，顯示 *SsERF-1* 可能會於處理後短時間內受乙烯影響，使其表現輕微提升；經 ACC 處理 6 小時 *SsERF-1* 表現下降，與控制組並無明顯不同；而經 ACC 處理 10 小時 *SsERF-1* 表現量又上升至控制組的約 2.2 倍，值得注意的是，實驗收取樣品時正好處於黑暗環境，顯示 *SsERF-1* 表現及乙烯調控路徑很可能也會受到環境明暗或光週期的影響，在含有 ACC 的黑暗環境下，進而誘導由乙烯訊號開啟之傳導路徑，使 *SsERF-1* 的表現受到輕微促進；最後，經 ACC 處理 24 小時後 *SsERF-1* 表現量又再度下降，並與控制組無顯著差異，顯示 *SsERF-1* 表現在 ACC 處理長時間後回到與控制組相同的水平（圖八）。綜上所述，大岩桐 *SsERF-1* 會在短時間內反應乙烯，受到促進而使表現量輕微上升，而後隨著處理時間增長，其表現可能便不再受乙烯影響；此外，乙烯訊號的響應及 *SsERF-1* 表現很可能也會受到環境光線或光週期調控，在含有乙烯的黑暗環境促進 *SsERF-1* 表現。



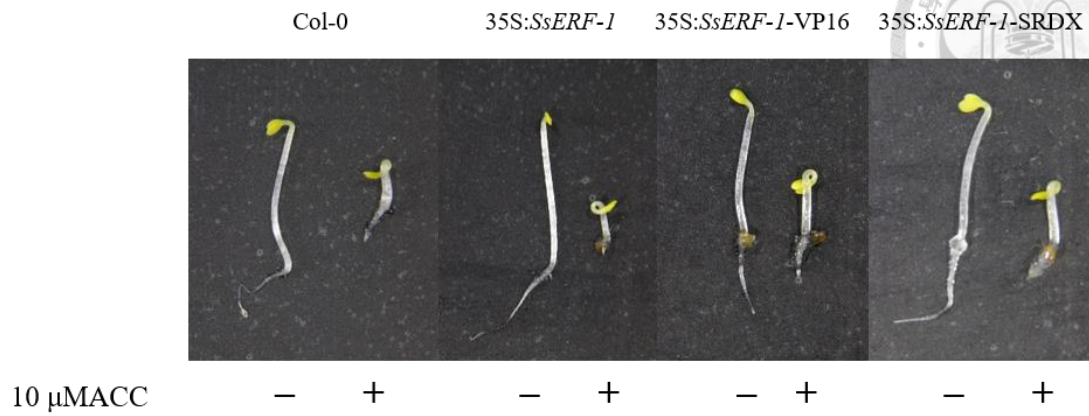
圖八、大岩桐第 5 期花苞經 0.1 mM 乙烯前驅物 ACC 處理不同時間後 *SsERF-1* 基因表現模式

將大岩桐第 5 期花苞瓶插於 0.1 mM ACC 溶液，於處理不同時間後以 qRT-PCR 檢驗花冠筒 *SsERF-1* 表現量，並與全程瓶插於 ddH₂O 的控制組比較。由左至右分別為處理後 1 小時、6 小時、10 小時及 24 小時。黑線圓形圖標為經 ACC 處理花苞，灰線三角形圖標則為全程瓶插於 ddH₂O 控制組。以 *SsACT7* 作為管家基因，並以置於處理後 1 小時之 ddH₂O 控制組作為基準，計算相對表現量 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)。數據以平均值 $\pm$ SE 呈現，圖上的星號代表樣品間之統計差異 (*, $0.01 < P < 0.05$; **, $0.001 < P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)。

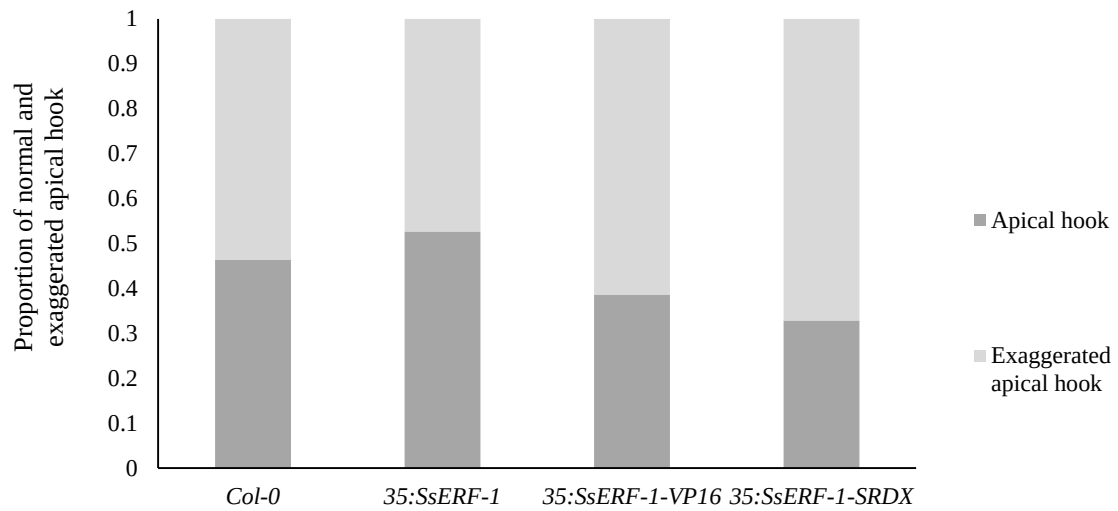
3.5 *SsERF-1* 可能並不參與植株對乙烯接收傳遞及敏感性

由於 *SsERF-1* 屬於乙烯反應因子，因此亦探討 *SsERF-1* 是否會影響植株對於乙烯的接收、傳遞與敏感性。透過建立 *SsERF-1* 於阿拉伯芥異位表達之 35S:*SsERF-1*、35S:*SsERF-1*-VP16 活化型及 35S:*SsERF-1*:SRDX 抑制型轉植株，以 RT-PCR 檢驗外來基因 *SsERF-1* 表現確認轉植株成功建立 (附錄圖五、六)，而後進行乙烯三相反應檢驗。在含有 10 μ M ACC 的培養基上於黑暗生長 3 天後，結果可見野生型 Col-0 與三種轉植株幼苗皆可觀察到乙烯三相反應的性狀，即較短的下胚軸與根、較粗下胚軸及頂端勾產生，且所有發芽的幼苗皆有產生乙烯三相反應性狀 (圖九 A)。而後，為了探討在相同 ACC 濃度的處理是否影響不同轉植株乙烯三相反應性狀的程度，我們將頂端勾的彎曲程度分為對折的一般彎曲 (圖九 C) 及有相交的嚴重彎曲 (圖九 D)，並記錄不同轉植株幼苗的彎曲程度比例。結果可見野生型 Col-0 的頂端勾一般彎曲佔 46.34 %、嚴重彎曲佔 53.66 %，35S:*SsERF-1* 轉植株的頂端勾一般彎曲佔 52.63 %、嚴重彎曲佔 47.37 %，35S:*SsERF-1*-VP16 轉植株的頂端勾一般彎曲佔 38.60 %、嚴重彎曲佔 61.40 %，35S:*SsERF-1*:SRDX 轉植株的頂端勾一般彎曲佔 32.81 %、嚴重彎曲佔 67.19 % (圖九 B)，不同轉植株頂端勾的彎曲程度並無特定趨勢，顯示在 10 μ M ACC 濃度下，*SsERF-1* 基因的表現可能並不影響植株幼苗期對乙烯的接收傳遞與反應。

A.



B.



C.



D.



圖九、黑暗環境 *SsERF-1* 阿拉伯芥轉殖株幼苗對乙烯的三相反應 (Ethylene Triple Response Assay) 結果

A、*SsERF-1* 阿拉伯芥異位表達之 35S:*SsERF-1* #1、35S:*SsERF-1*-VP16 #1、35S:*SsERF-1*:SRDX #4 轉殖株與野生型 (WT) Col-0 幼苗的乙烯三相反應結果，黑暗環境生長在含 10 μ M ACC 的環境具有較短且較粗的下胚軸 (hypocotyl)，並產生明顯的頂端勾 (apical hook)。左側 (-) 為生長於不含 ACC 培養基，右側 (+) 則為生長於含 10 μ M ACC 培養基。B、*SsERF-1* 阿拉伯芥異位表達之 35S:*SsERF-1* #1、35S:*SsERF-1*-VP16 #1、35S:*SsERF-1*:SRDX #4 轉殖株與野生型 (WT) Col-0 幼苗頂端勾的彎曲程度比例。深灰色為較不明顯的頂端勾彎曲 (C)，淺灰色則為較嚴重的頂端勾彎曲，有明顯彎曲至相交 (exaggerated apical hook) (D)。各處理約取 40~60 株幼苗計算。

3.6 *SsERF-1* 會減緩阿拉伯芥轉植株的生長速度

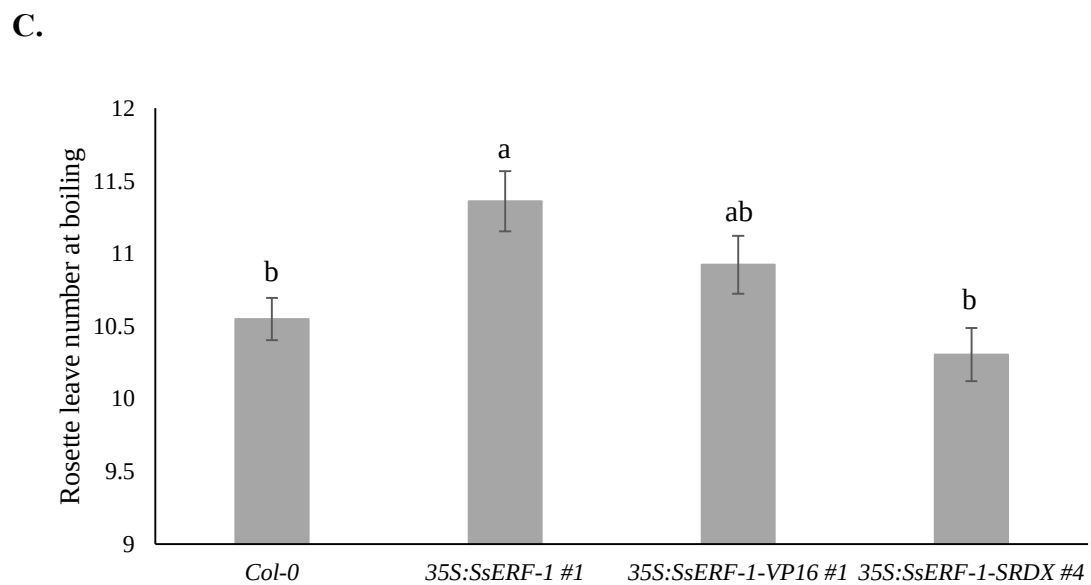
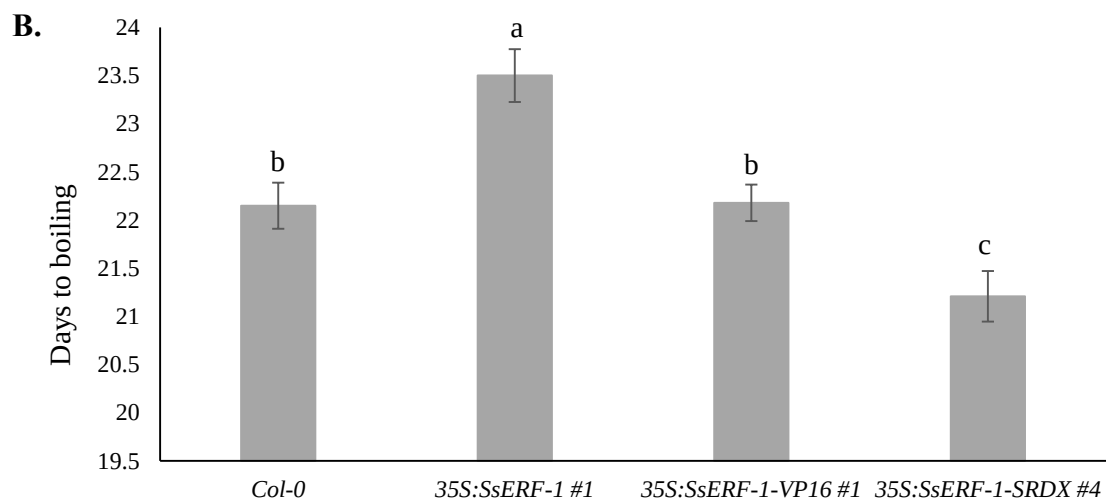
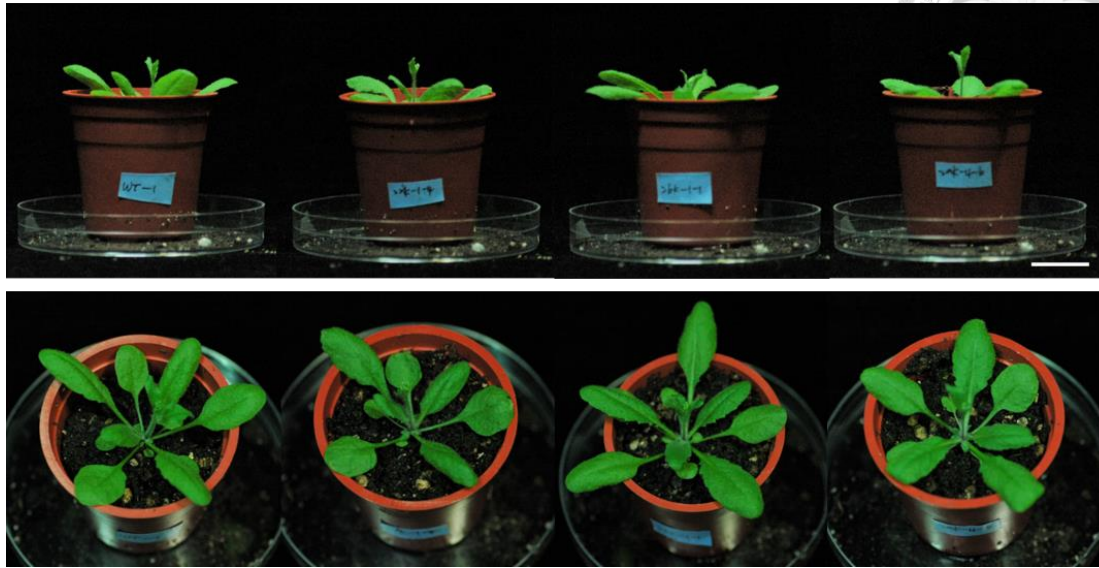


為了探討 *SsERF-1* 基因功能及其對植株生長的影響，透過 *SsERF-1* 於阿拉伯芥異位表達之 35S:*SsERF-1*、35S:*SsERF-1*-VP16 及 35S:*SsERF-1*:SRDX 轉植株進行性狀觀察，並與野生型 Col-0 比較以達成 *SsERF-1* 功能性探討。首先透過阿拉伯芥植株花梗生長至 1 cm 的天數及基部簇生葉片 (rosette) 數量觀察植株進入繁殖階段的時間，以探討 *SsERF-1* 對植株開花時間的影響，可見野生型 Col-0 植株於播種後約 22.15 (± 0.24) 天花梗生長至 1 cm，而 35S:*SsERF-1* 轉植株在播種後 23.5 (± 0.27) 天，35S:*SsERF-1*-VP16 轉植株在播種後 22.17 (± 0.26) 天，35S:*SsERF-1*:SRDX 轉植株則在播種後 21.21 (± 0.19) 天 (圖十 A、B)；而野生型 Col-0 植株花梗生長至 1 cm 時的簇生葉片數量為 10.55 (± 0.15) 片，而 35S:*SsERF-1* 轉植株為 11.36 (± 0.21) 片，35S:*SsERF-1*-VP16 轉植株為 10.92 (± 0.20) 片，35S:*SsERF-1*:SRDX 轉植株則為 10.30 (± 0.18) 片 (圖十 A、C)，雖然簇生葉片數量分析並無顯著差異，但可見 35S:*SsERF-1* 及 35S:*SsERF-1*-VP16 轉植株有相同的趨勢，會較晚進入繁殖階段且需要較多的營養葉，並說明 *SsERF-1* 很可能為一轉錄活化子 (transcriptional activator)；反之，35S:*SsERF-1*:SRDX 轉植株則會較早進入繁殖階段且需要較少的營養葉，顯示 *SsERF-1* 基因可能會稍微延後植株的開花時間。

為了進一步探討 *SsERF-1* 轉植株在同一時間下是否確實處於不同的生長階段，觀察植株在播種後約 3 至 4 週時的植株高度及外觀，可見野生型 Col-0 株高約為 14.73 (± 0.81) cm，而 35S:*SsERF-1* 轉植株的株高約為 8.67 (± 1.57) cm，35S:*SsERF-1*-VP16 轉植株的株高約為 12.53 (± 0.96) cm，35S:*SsERF-1*:SRDX 轉植株的株高則為 17.49 (± 0.60) cm，且結果分析皆具有顯著差異，顯示在播種後同一時間下，35S:*SsERF-1* 及 35S:*SsERF-1*-VP16 會產生較矮的植株，反之，35S:*SsERF-1*:SRDX 則產生較高的植株 (圖十一 A-C、附錄圖六)。此外，相較於

野生型 Col-0 之主莖 (primary shoot) 上生長出次級分枝 (Secondary shoot)、且簇生莖上亦初長出側枝 (lateral shoot)，35S:*SsERF-1* 及 35S:*SsERF-1*-VP16 轉植株皆尚未生長出側枝，反之，35S:*SsERF-1*-SRDX 轉植株已有較成熟且發達的側枝及次級分枝，部分性狀更為明顯的植株甚至已於次級分枝上生長出三級分支 (tertiary shoot)，顯示相較於野生型 Col-0，在播種後 3 至 4 週 35S:*SsERF-1* 及 35S:*SsERF-1*-VP16 轉植株的生長較慢，而 35S:*SsERF-1*-SRDX 轉植株則已在較成熟的生長階段，說明 *SsERF-1* 確實會減緩植株生長速度及延後進入繁殖時期的時間。

A. *Col-0* *35S:SsERF-1* #1 *35S:SsERF-1-VP16* #1 *35S:SsERF-1-SRDX* #4



圖十、長日照環境下 *SsERF-1* 阿拉伯芥轉殖株的開花時間及開花時簇生葉數量

A、*SsERF-1* 阿拉伯芥異位表達之 35S:*SsERF-1* #1、35S:*SsERF-1*-VP16 #1、35S:*SsERF-1*:SRDX #4 轉殖株與野生型 (WT) Col-0 植株在長日照下花梗生長至 1 cm 時的側面圖 (上) 及俯瞰圖 (下)。B、*SsERF-1* 阿拉伯芥轉殖株及野生型 Col-0 植株長日下花梗生長至 1 cm 的天數 (播種後的天數)。植株數量約為 30~60 棵。C、*SsERF-1* 阿拉伯芥轉殖株及野生型 Col-0 植株在長日照下花梗生長至 1 cm 時的簇生狀葉片 (rosette) 數量。植株數量約為 25-35 棵。數據以平均值 $\pm$ SE 呈現，圖上不同英文字母代表樣品間具有顯著差異 ($P < 0.05$)

A.

Col-0

35S:SsERF-1 #1

35S:SsERF-1-VP16 #1

35S:SsERF-1-SRDX #4



B.

Col-0

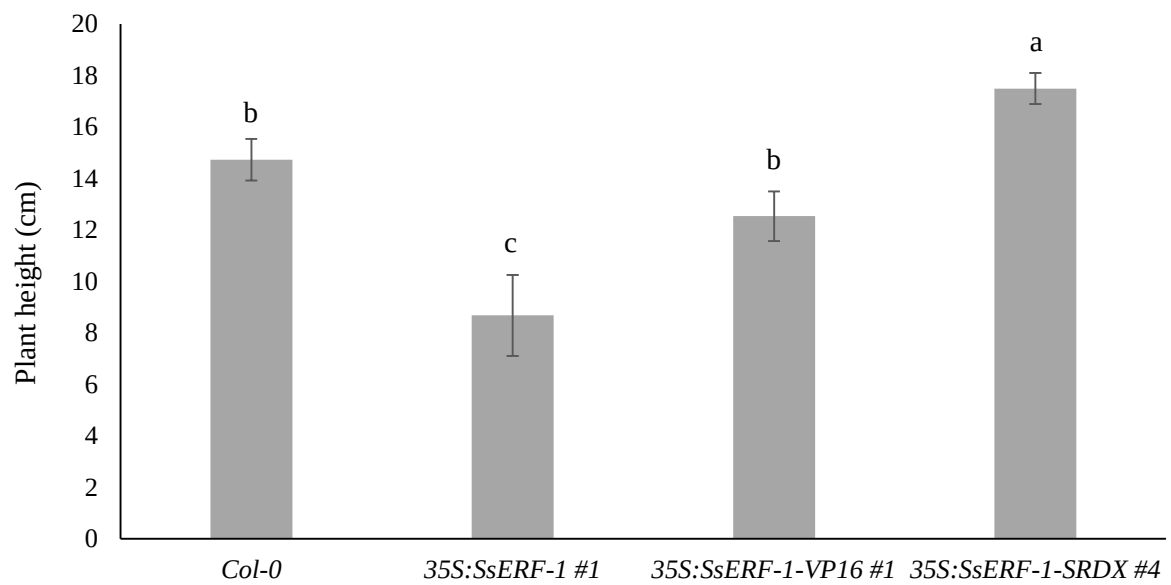
35S:SsERF-1 #1

35S:SsERF-1-VP16 #1

35S:SsERF-1-SRDX #4



C.



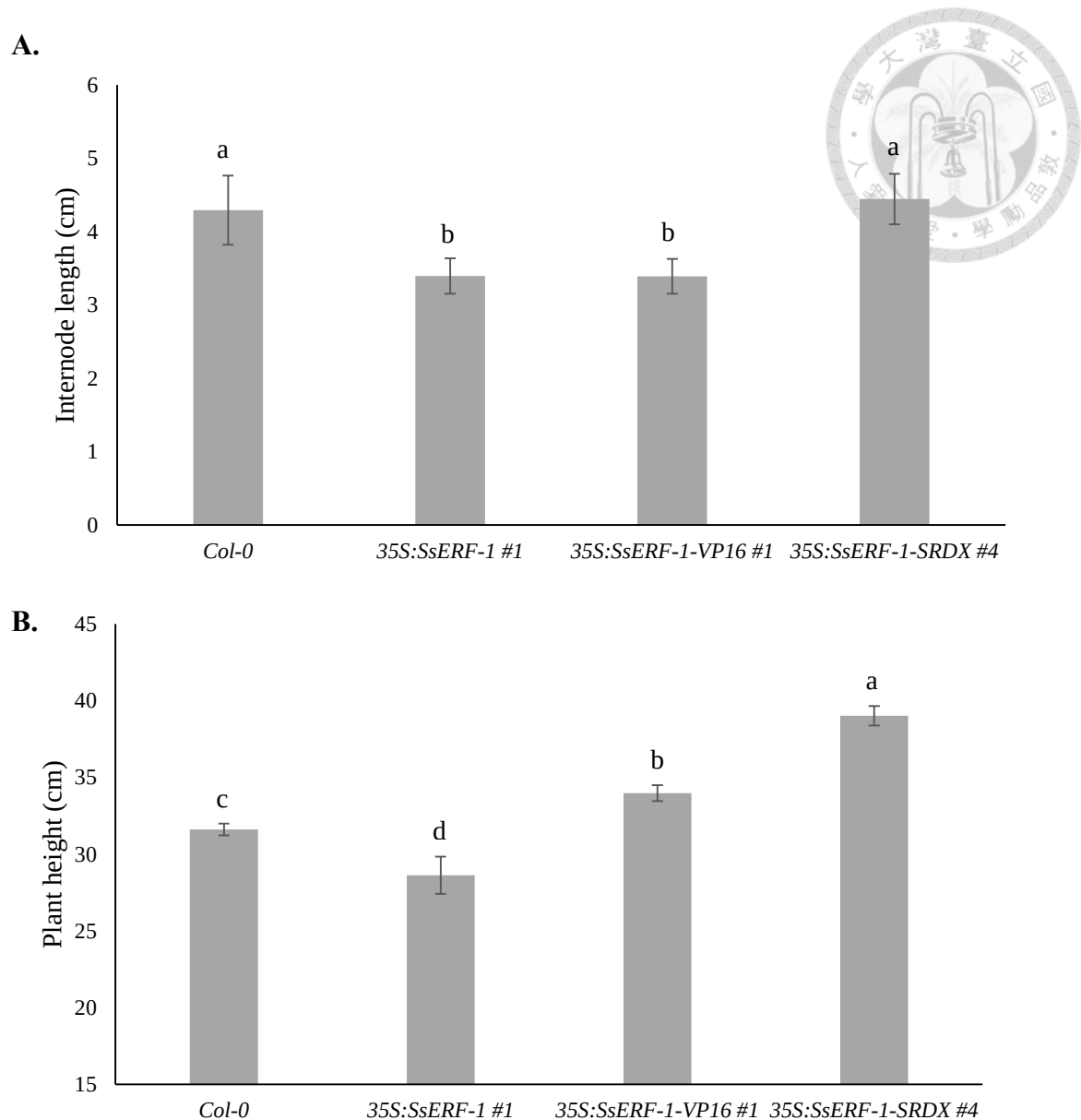
圖十一、長日環境株齡 4-5 週 *SsERF-1* 阿拉伯芥轉殖株的植株、花朵形態及株高



A、*SsERF-1* 阿拉伯芥異位表達之 35S:*SsERF-1* #1、35S:*SsERF-1*-VP16 #1、35S:*SsERF-1*:SRDX #4 轉殖株與野生型 (WT) Col-0 在長日約 4-5 週大時的植株。Bar = 2 cm。B、*SsERF-1* 阿拉伯芥異位表達之 35S:*SsERF-1* #1、35S:*SsERF-1*-VP16 #1、35S:*SsERF-1*:SRDX #4 轉殖株與野生型 (WT) Col-0 花朵外觀。C、*SsERF-1* 阿拉伯芥異位表達之 35S:*SsERF-1* #1、35S:*SsERF-1*-VP16 #1、35S:*SsERF-1*:SRDX #4 轉殖株與野生型 (WT) Col-0 在長日約 4-5 週植株高度。植株數量約為 7-8 棵。數據以平均值 $\pm$ SE 呈現，圖上不同英文字母代表樣品間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

3.7 *SsERF-1* 會輕微抑制阿拉伯芥轉植株節間的生長及最終株高

發現 *SsERF-1* 會減緩轉植株的生長後，接著進一步觀察 *SsERF-1* 是否會影響整體植株大小。首先，初步肉眼觀察幼苗初生根及葉片大小皆無明顯差異，而後測量阿拉伯芥轉植株主莖上分支與分支的距離，即節間 (inflorescence internode) 長度，野生型 Col-0 的節間長度為 $4.29 (\pm 0.47)$ cm，35S:*SsERF-1* 轉植株為 $3.39 (\pm 0.24)$ cm，35S:*SsERF-1*-VP16 轉植株為 $3.39 (\pm 0.24)$ cm，而 35S:*SsERF-1*-SRDX 轉植株則為 $4.44 (\pm 0.34)$ cm，可見 35S:*SsERF-1* 和 35S:*SsERF-1*-VP16 轉植株有相同的趨勢，即 *SsERF-1* 過度表現後會些微抑制節間生長，反之，35S:*SsERF-1*-SRDX 轉植株在統計上雖無顯著差異，但節間長度仍較野生型略長一些，顯示 *SsERF-1* 基因或許會影響植株節間的生長 (圖十二 A)。接著，我們亦在轉植株於播種後約兩個月停止澆水，並等待植株完全死亡停止生長，而後測量轉植株的最終株高，野生型 Col-0 最終株高為 $31.61 (\pm 0.38)$ cm，35S:*SsERF-1* 轉植株為 $28.63 (\pm 1.21)$ cm，35S:*SsERF-1*-VP16 轉植株為 $33.99 (\pm 0.52)$ cm，而 35S:*SsERF-1*-VP16 轉植株則為 $39.02 (\pm 0.64)$ cm，相較於野生型，可見 *SsERF-1* 過度表現後會使最終株高減少。反之，*SsERF-1* 抑制型轉植株則會使最終株高增加，雖然 35S:*SsERF-1*-VP16 轉植株的結果趨勢與 35S:*SsERF-1* 轉植株不一致，但仍可推測 *SsERF-1* 基因或許會影響植株最終株高的生長 (圖十二 B、附錄圖六)。



圖十二、長日照環境下 *SsERF-1* 阿拉伯芥轉殖株主莖節間長度及最終株高

A、*SsERF-1* 阿拉伯芥異位表達之 35S:*SsERF-1* #1、35S:*SsERF-1*-VP16 #1、35S:*SsERF-1*:SRDX #4 轉殖株與野生型 (WT) Col-0 在長日生長之主莖節間 (inflorescence internode) 長度。約取 8-15 棵植株計算，總節間數量約為 30-60。

B、*SsERF-1* 阿拉伯芥異位表達之 35S:*SsERF-1* #1、35S:*SsERF-1*-VP16 #1、35S:*SsERF-1*:SRDX #4 轉殖株與野生型 (WT) Col-0 在長日生長之最終植株高度。植株數量約為 7-8 棵。數據以平均值 $\pm$ SE 呈現，圖上不同英文字母代表樣品間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

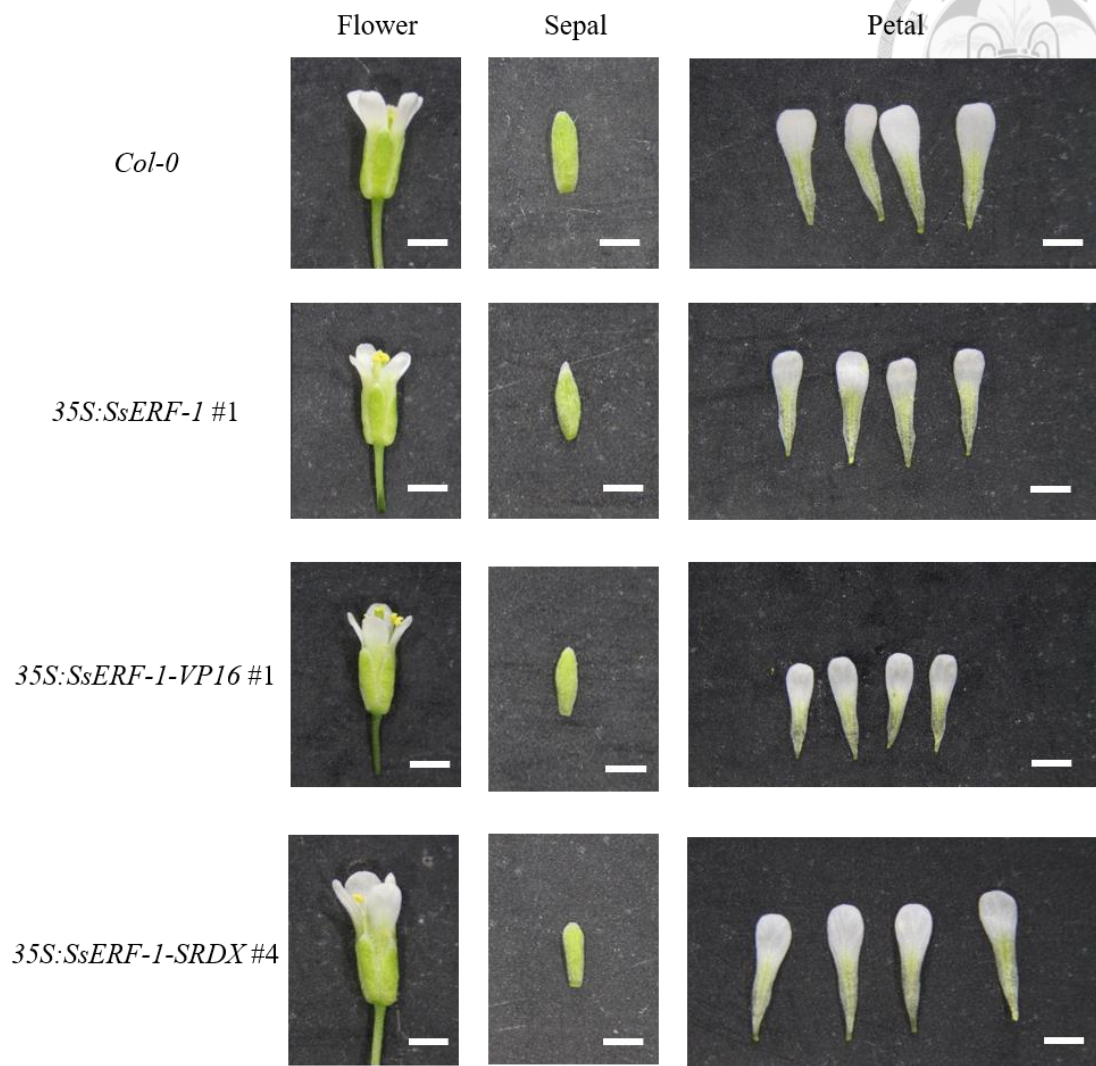
3.8 *SsERF-1* 會透過抑制細胞延長使轉植株產生較小的花瓣

接著，由於本研究更關心 *SsERF-1* 基因對花朵生長的影響，因此將 *SsERF-1* 阿拉伯芥轉植株的性狀觀察局限至花器官。首先，野生型 Col-0 植株具有 4 片萼片、4 片花瓣、6 個雄蕊及 2 個心皮，而相較於野生型 Col-0，35S:*SsERF-1*、35S:*SsERF-1*-VP16 及 35S:*SsERF-1*-SRDX 三種轉植株的花朵形態於肉眼觀察下皆無異常，且花瓣、萼片、雄蕊及心皮等花器官都沒有異於野生型 Col-0 的數量和形狀，花朵盛開的角度亦與野生型 Col-0 一致，顯示 *SsERF-1* 並不會影響植株花器官的分化等性狀 (圖十一 B、圖十三 A)。其次，摘下花瓣並測量花瓣面積，相較於野生型 Col-0 花瓣面積為 $1.680 (\pm 0.014) \text{ mm}^2$ ，35S:*SsERF-1* 轉植株為 $1.439 (\pm 0.017) \text{ mm}^2$ ，35S:*SsERF-1*-VP16 轉植株為 $1.439 (\pm 0.016) \text{ mm}^2$ ，而 35S:*SsERF-1*-SRDX 轉植株則為 $1.776 (\pm 0.025) \text{ mm}^2$ ，可見 35S:*SsERF-1* 及 35S:*SsERF-1*-VP16 轉植株有相同的趨勢，皆產生較小的花瓣；反之，35S:*SsERF-1*-SRDX 轉植株則會產生較大的花瓣，顯示 *SsERF-1* 基因會抑制轉植株花瓣大小生長 (圖十三 B、附錄圖六)。

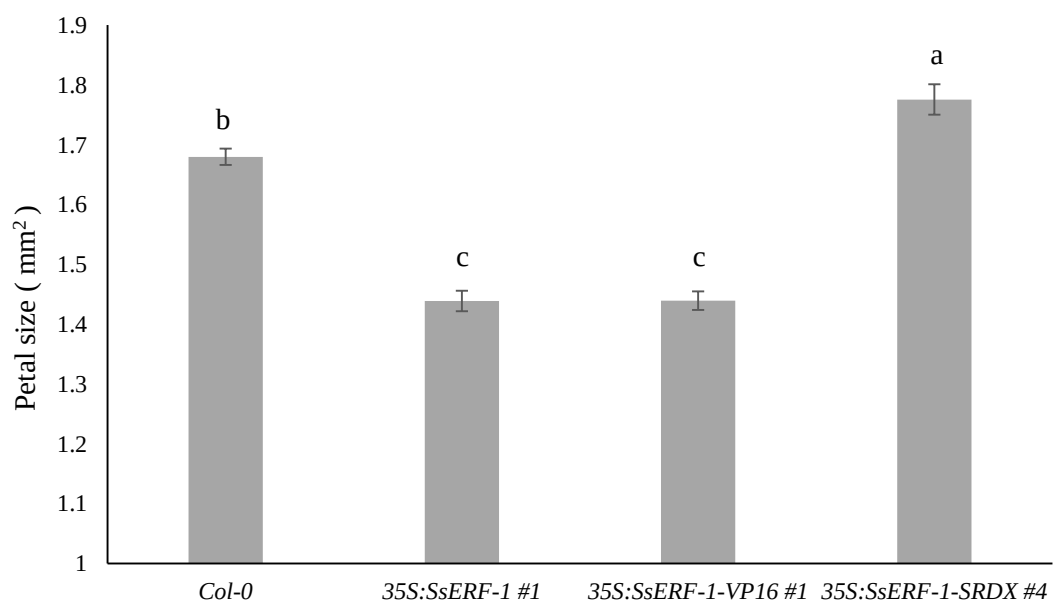
進一步為了探討不同阿拉伯芥轉植株花瓣面積大小的差異是由細胞延長或細胞分裂所致，利用花瓣透明法處理並以光學顯微鏡觀察上表皮細胞，將花瓣分為靠近花梗的基部部分 (proximal) 及花瓣前端的遠端部分 (distal) 分別拍照記錄並計算花瓣面積比較 (圖十四、圖十五 A、B)。首先，阿拉伯芥轉植株花瓣遠端上表皮細胞形態近似圓形並緊密排列，而相較於野生型 Col-0 的遠端上表皮細胞面積為 $141.193 (\pm 1.828) \mu\text{m}^2$ ，35S:*SsERF-1* 轉植株為 $126.631 (\pm 1.783) \mu\text{m}^2$ ，35S:*SsERF-1*-VP16 轉植株為 $124.226 (\pm 1.708) \mu\text{m}^2$ ，而 35S:*SsERF-1*-SRDX 轉植株則為 $177.754 (\pm 2.825) \mu\text{m}^2$ ，顯示 35S:*SsERF-1* 及 35S:*SsERF-1*-VP16 轉植株有相同的趨勢，皆會抑制花瓣遠端細胞延長而產生較小的上表皮細胞；反之，35S:*SsERF-1*-SRDX 轉植株則是促進花瓣遠端細胞延長而產生較大的上表皮細胞。

胞 (圖十四、圖十五 A)。另一方面，阿拉伯芥轉植株花瓣基部上表皮細胞則是排列整齊的長條形細胞，同樣地，相較於野生型 Col-0 基部上表皮細胞面積為 $880.915 (\pm 25.871) \mu\text{m}^2$ ，35S:*SsERF-I* 轉植株為 $778.341 (\pm 20.290) \mu\text{m}^2$ ，35S:*SsERF-I*-VP16 轉植株為 $787.796 (\pm 29.318) \mu\text{m}^2$ ，而 35S:*SsERF-I*-SRDX 轉植株則為 $1059.291 (\pm 35.867) \mu\text{m}^2$ ，同樣顯示 35S:*SsERF-I* 及 35S:*SsERF-I*-VP16 轉植株有相同的趨勢，皆會抑制花瓣基部細胞的延長而產生較小的上表皮細胞；反之，35S:*SsERF-I*-SRDX 轉植株則是促進花瓣遠端細胞的延長而產生較大的上表皮細胞 (圖十四、圖十五 B)。綜上所述，可以明顯推測 *SsERF-I* 基因會透過抑制細胞延長使花瓣細胞變小，進而產生較小的花瓣。

A.

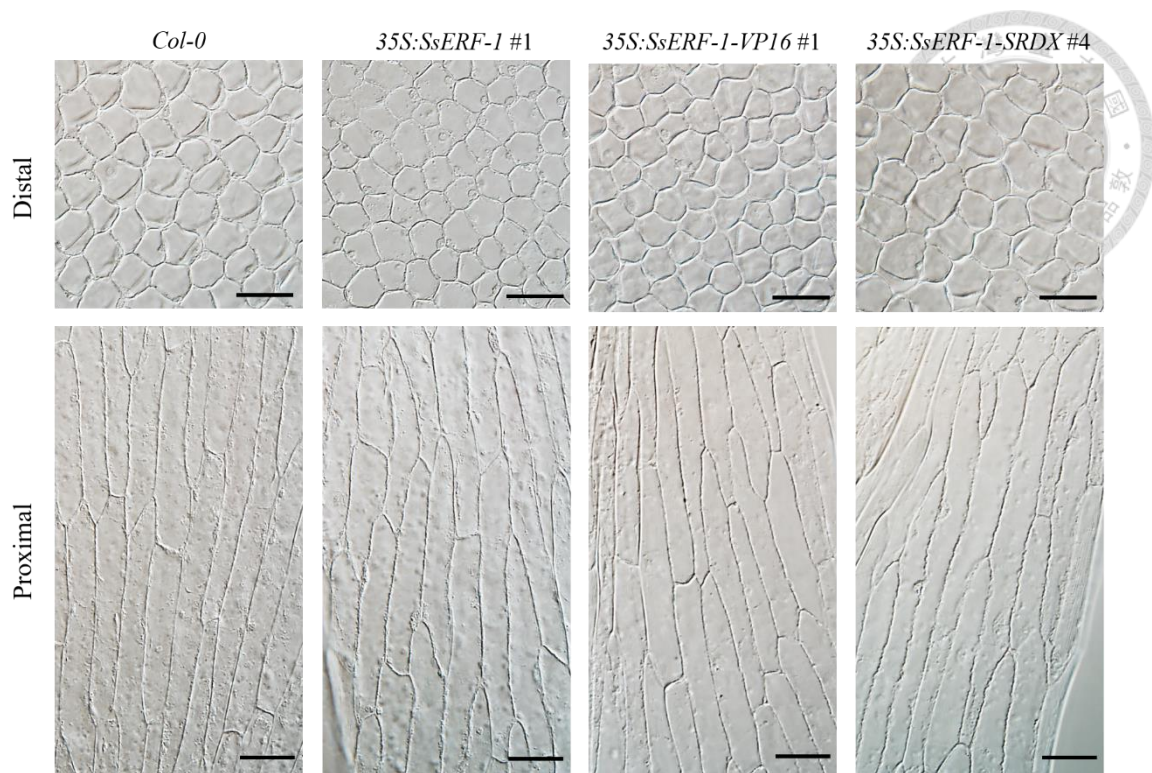


B.



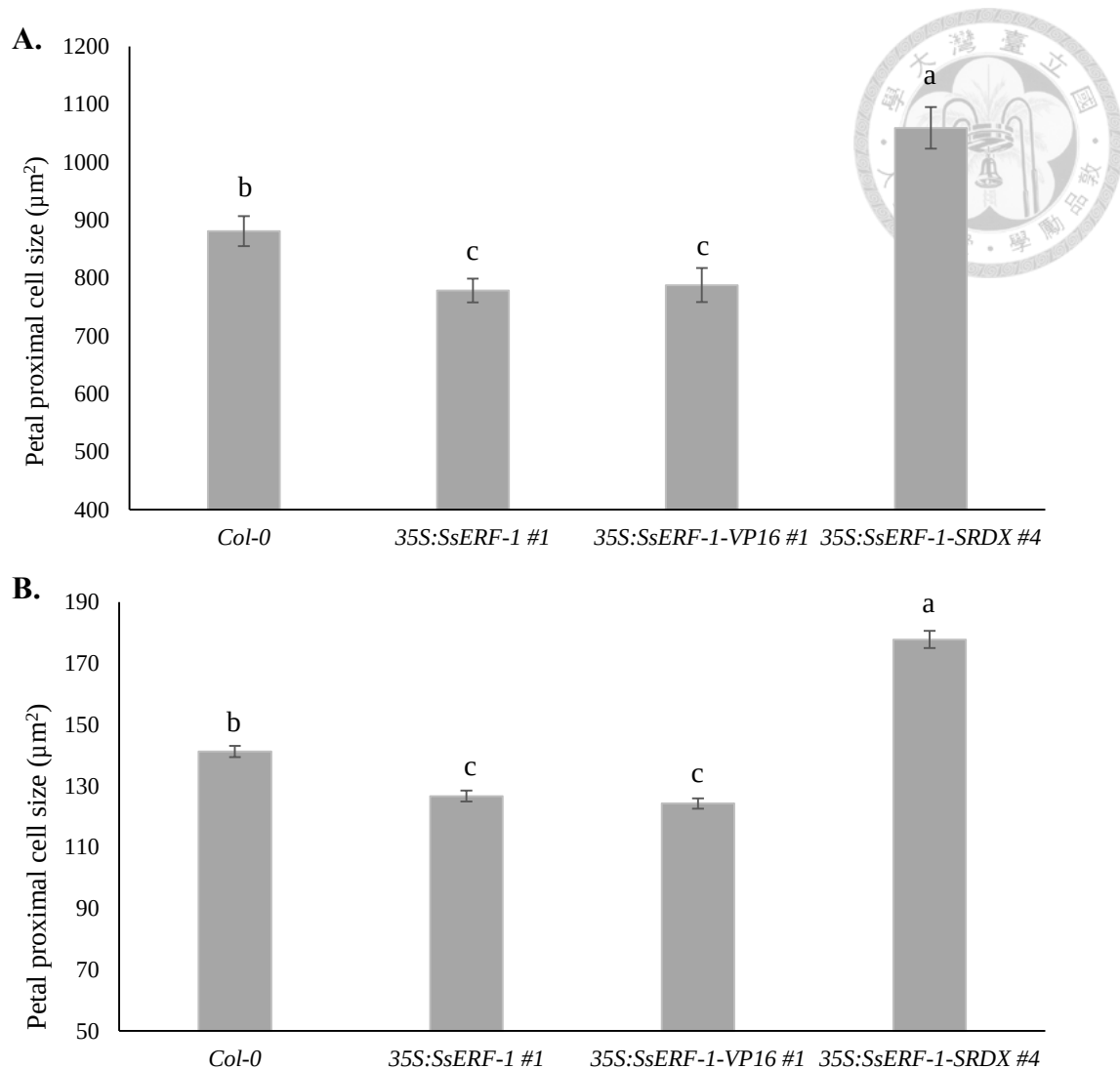
圖十三、長日照環境下 *SsERF-1* 阿拉伯芥轉殖株的花朵、萼片、花瓣外觀及花瓣面積

A、*SsERF-1* 阿拉伯芥異位表達之 35S:*SsERF-1* #1、35S:*SsERF-1*-VP16 #1、35S:*SsERF-1*:SRDX #4 轉殖株與野生型 (WT) Col-0 花朵 (flower)、萼片 (sepal) 及花瓣 (petal) 外觀。Bar = 1 mm。B、*SsERF-1* 阿拉伯芥異位表達之 35S:*SsERF-1* #1、35S:*SsERF-1*-VP16 #1、35S:*SsERF-1*:SRDX #4 轉殖株與野生型 (WT) Col-0 花瓣面積。花瓣數量約為 135-225 片。數據以平均值 $\pm$ SE 呈現，圖上不同英文字母代表樣品間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。



圖十四、長日照環境 *SsERF-1* 阿拉伯芥轉殖株花瓣上表皮基部、遠端細胞外形態

以光學顯微鏡拍攝 *SsERF-1* 阿拉伯芥異位表達之 35S:*SsERF-1* #1、35S:*SsERF-1*-VP16 #1、35S:*SsERF-1*:SRDX #4 轉殖株與野生型 (WT) Col-0 花瓣上表皮遠端細胞 (distal cell, 上) 及花瓣基部細胞 (proximal cell, 下) 形態。遠端指花瓣前端的部分，基部指靠近與花梗連接處的部分。Bar = 20 μ m。



圖十五、長日照環境 *SsERF-1* 阿拉伯芥轉殖株花瓣基部、遠端上表皮細胞面積

A、*SsERF-1* 阿拉伯芥異位表達之 35S:*SsERF-1* #1、35S:*SsERF-1*-VP16 #1、35S:*SsERF-1*:SRDX #4 轉殖株與野生型 (WT) Col-0 花瓣遠端上表皮細胞 (distal cell) 面積。細胞數量約為 250-400 個。B、*SsERF-1* 阿拉伯芥異位表達之 35S:*SsERF-1* #1、35S:*SsERF-1*-VP16 #1、35S:*SsERF-1*:SRDX #4 轉殖株與野生型 (WT) Col-0 花瓣基部上表皮細胞 (proximal cell) 面積。細胞數量約為 60-100 個。數據以平均值 $\pm$ SE 呈現，圖上不同英文字母代表樣品間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

第四章 討論



花朵的兩側對稱性為被子植物促進繁殖成功率的一大特徵，而其調控模組最先已在金魚草發現，闡明屬於 TCP class II 轉錄因子成員的 *CYCLOIDEA* (*CYC*) 基因在主導植物花朵對稱性扮演重要角色，其會在背側花瓣高度表現，並使背腹側花瓣生長發育出不同的性狀，如特殊的花型、花瓣大小、花色、花斑等 (Costa et al., 2005; Hileman, 2014; Spencer & Kim, 2018)，而此現象也同樣在大岩桐中被發現 (Dong et al., 2018)，然而除了廣為人知的 *CYC-RAD-DIV* 模組外，其他參與花朵對稱性調控網絡的潛在基因卻仍鮮少被研究。本研究以大岩桐作為實驗材料，並透過 RNA-seq 篩選，將目標基因鎖定屬於乙烯反應因子 (ERF) 的 *SsERF-1* 基因，其於大岩桐花苞背側花瓣有較高的表現、且啟動子上具有 TCP class II 結合位點，更由實驗室過去研究發現 *SsERF-1* 可能會受到 *SsCYC* 的促進 (王佩琦, 2019)。本篇研究針對乙烯對大岩桐花苞生長的影響、乙烯與 *SsERF-1* 的關係及 *SsERF-1* 對植株生長發育的調控，進而探討乙烯與 *SsERF-1* 基因對大岩桐花朵發育的潛在關聯。

4.1 乙烯及乙烯調控路徑對花朵生長的調控

乙烯是參與調控植物眾多發育階段的重要激素之一，如器官的生長、花朵衰老與掉落、果實後熟、逆境反應等，而在大岩桐花苞處理乙烯前驅物 ACC 的結果中，可見乙烯的效應會透過抑制大岩桐花筒及裂片表皮細胞的延長，進而產生較小的花瓣與花苞 (圖四、五、六、七)。而由過去文獻回顧，已有許多乙烯調控不同物種花朵大小發育的案例與研究，尤其透過抑制細胞延長進行調控居多，如非洲菊乙烯傳導路徑中的 *GhEIL1* 會反應乙烯並促進其下游基因 *GEG*，進而透過調控細胞延長以抑制舌狀花 (ray petals) 的生長 (Huang et al., 2020)。玫瑰乙烯

傳導路徑中的 *RhEIN3-3* 會受乙烯誘導並促進 *GA INSENSITIVE 1*，進而抑制玫瑰花瓣細胞的延長；受乙烯促進的 *RhNAC100* 會透過抑制細胞延長使花瓣生長較小，而該基因則是受到 *microRNA164* 依賴性後轉錄調控調節 (Luo et al., 2013; Pei et al., 2013)。此外，更有許多研究指出乙烯會與不同荷爾蒙路徑相互調節，共同參與植物器官的生長發育，如番茄 (*Solanum lycopersicum*) *MADS-BOX PROTEIN 21 (SIMBP21)* 會受到乙烯及生長素的共同調控並抑制萼片細胞延長，且 *SIMBP21* 下調亦會影響乙烯合成與游離態 IAA 的累積 (N. Li et al., 2017)。玫瑰的生長素反應因子成員 *RhIAA14* 會受到乙烯促進並透過調控細胞延長抑制花瓣大小的生長；而玫瑰 *Nuclear transcription factor Y subunit C-9* 則會受到乙烯抑制，並降低吉貝素合成基因表現，同時促進吉貝素代謝基因表現，進而影響吉貝素的積累等 (Chen et al., 2020; Jia et al., 2022)。這些研究皆顯示乙烯對植物器官生長發育的重要性，及其與不同荷爾蒙調控網間交互作用的潛在可能，提供探討乙烯處理對大岩桐花苞生長效應之確切路徑的研究方向。

值得注意的是，大岩桐花苞經乙烯前驅物 ACC 處理後，可見相較於未處理控制組，腹側花瓣細胞面積減少的程度較背側花瓣細胞更為明顯，背側花筒及裂片細胞面積約減少 8-33%，而腹側細胞面積則是約減少 24-40% (附錄表四、五)，顯示腹側花瓣對乙烯的反應似乎較背側花瓣敏感；此外，亦有極少數 ACC 處理組花苞出現部分花瓣區域扭曲變形現象，而部分處理組花苞萼片亦會出現外翻的偏上生長 (epinasty)，換言之，同樣乙烯濃度處理的花朵卻可能在不同部位產生差異性生長。由文獻回顧可得，玫瑰花朵受乙烯處理後，花瓣基部近軸面與遠軸面對乙烯的敏感性不同，使得細胞大小出現差異性生長，透過花瓣近軸面細胞較遠軸面者大而加速花朵盛開，而此效應正是因乙烯傳導路徑中的 *RhEIN3* 促進下游 *RhPMP1* 等調控核內複製的基因所致 (Cheng et al., 2021)。除了花朵外，亦有許多植物營養器官會受乙烯調控而產生差異性生長現象，如受到水淹沒的酸模

屬 (*Rumex palustris*) 植株、或受到遮陰競爭的植株如菸草 (*Nicotiana tabacum*)，會誘導葉柄伸長，並使葉片較為直立、提升縱向生長 (hyponastic growth)，而此造成葉片角度不同的葉柄基部差異性生長正是由低濃度的乙烯所介導 (Cox et al., 2003; Pierik et al., 2003; Voesenek & Blom, 1989)；番茄 *Sl-IAA3* 會扮演乙烯與生長素調控路徑間交互作用的交叉口，影響葉柄的偏上生長與頂端勾等差異性生長 (Chaabouni et al., 2009)；金魚草切花的花莖彎曲現象也被證實與乙烯調控有關，經由莖部不同區域乙烯的積累，透過差異性生長進而使莖部彎曲 (Naing et al., 2021; Philosoph-Hadas et al., 1996; Soe et al., 2022)。這些研究皆顯示乙烯可能參與調控植物發育及在不同生長階段或外界刺激下的差異性生長。

4.2 乙烯反應因子 Group IX 及在親緣關係上 *SsERF-1* 可能扮演的調控角色

乙烯反應因子是植物最大的轉錄因子家族之一，在模式物種阿拉伯芥中目前已發現 122 個成員基因，雖然其中有部分和乙烯傳遞、植株衰老及逆境反應相關的重要基因已有許多研究與發展，然而大多數的基因仍缺乏較完整的功能性探討，而對其在植株發育過程所扮演的角色充滿未知。透過與阿拉伯芥 ERF 轉錄因子家族 122 個成員基因進行序列比對並建立親緣關係樹後，可見大岩桐的目標基因 *SsERF-1* 被分屬於 Group IX 的 IXa 子群，而與其最為相近的基因為 *AtERF-1* (AT4G17500) 和 *AtERF2* (AT5G47220) 及同屬於此子群的 *AtERF13* (AT2G44840)，並在近 N 端處具有保守的 CMIX-3 Motif，而被認為可作為轉錄活化子 (transcription activator) (圖二 A-C)，而由三種 *SsERF-1* 阿拉伯芥異位表達轉植株的性狀比較，可發現 35S:*SsERF-1* 與 35S:*SsERF-1*-VP16 活化型轉植株有相同的性狀變化傾向；反之，35S:*SsERF-1*:SRDX 抑制型轉植株則有與前二者相反的性狀變化趨勢，說明 *SsERF-1* 很可能扮演轉錄活化子的角色。Group IX 類群基因目前已知大多與逆境反應有關，而 IXa 子群中，*AtERF-1* 及 *AtERF2*

具有高度的序列相似度，此二基因已被證實會受乙烯促進表現，而 *AtERF13* 則不會受乙烯調控，於不同組織表現模式分析顯示 *AtERF-1* 及 *AtERF13* 皆在花和簇生葉片有較高的表現量 (Fujimoto et al., 2000; Oñate-Sánchez & Singh, 2002)。

Group IX a 子群基因一般被認為與植物的抗病防禦相關，*AtERF-1* 和 *AtERF2* 基因序列與 *Pti4* (與抗病激酶 *Pto* 的產物具有交互作用) 高度相似，而 *AtERF-1*、*AtERF2* 及 *AtERF13* 皆會受到番茄細菌性斑點病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000) 感染後促進表現。此外，*AtERF-1* 及其被 Mitogen-activated protein kinase 3/6 磷酸化會介導灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*) 所誘導之乙烯生合成負回饋調控，並促進防禦素基因 (Defensins) 的表現以抵禦灰霉病菌感染 (Oñate-Sánchez & Singh, 2002; Wang et al., 2022)；而番茄 *ERF2* 除了可以增加對灰霉病菌的抗性外，亦會受番茄匍柄黴 (*Stemphylium lycopersici*) 促進，並參與水楊酸 (salicylic acid, SA)、茉莉酸 (jasmonic acid, JA) 及 活性氧類 (reactive oxygen species, ROS) 等多條與逆境相關的調控網絡，且可能調控 *Pto*、*Pathogenesis-Related Protein 1b1* 和 *Pathogenesis-Related-P2* 等抗病基因表現，以抵禦番茄匍柄黴的感染 (He et al., 2001; Yang et al., 2021)。另一方面，*AtERF13* 會受到茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 促進，*AtERF-1* 則是會被茉莉酸甲酯及水楊酸促進，而 *AtERF-1* 亦與抗病基因 *ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 5* 及水楊酸生合成相關基因有交互作用，皆顯示除了乙烯外，這些 *ERF* 基因亦與其他和病原體感染相關的植物激素調控有關 (Oñate-Sánchez & Singh, 2002; Zhou et al., 2018)。除了逆境反應外，近期亦有文獻報導指出 *ERF-1* 基因與植物根部的次級生長有關，如阿拉伯芥的 *AtERF-1* 會透過抑制次級生長而使植株根部有較小的截面積，且會透過 PHLOEM INTERCALATED WITH XYLEM 路徑參與形成層細胞分裂調控，並作為植株逆境反應 (如乾旱等) 與根部次級生長調控網絡的樞紐，以整合植株反應外界逆境及生長發育的平衡 (Etchells et al., 2012; Hoang et al., 2020)。蘋果 (*Malus domestica*)

MdERF2 近期則被指出會受乙烯調控，並參與蘋果果實表皮蠟質合成及結構組成 (Yingjie et al., 2022)。由這些文獻回顧可見 *AtERF-1* 等基因的功能性探討主要局限於逆境反應的調控，而鮮少探究其對植株發育器官大小等生長性狀。

除了 Group IXa 子群外，Group IX 中有許多成員基因被證實與植物的生長發育相關，如 *AtERF1* (AT3G23240) 便是已被廣泛研究的重要基因，其位處乙烯調控路徑的下游並會直接被 *EIN3* 調控，除了參與調控乙烯及茉莉酸相關的防禦機制及鹽、乾旱等非生物性逆境外，更會在黑暗中抑制初生根及下胚軸的生長，此外，其可直接結合促進 *ANTHRANILATE SYNTHASE 1* 進而導致生長素累積和乙烯所誘導的根生長抑制，扮演乙烯傳導路徑與生長素合成的調控樞紐 (Mao et al., 2016; Solano et al., 1998)；水稻 *OsERF1* 的阿拉伯芥異位表達轉植株及番茄 *TERF1* 的菸草異位表達轉植株亦會產生明顯較小的葉片及矮小植株 (Hu et al., 2008; Huang et al., 2004)。此外，冗餘的 *AtERF5* (AT5G47230) 和 *AtERF6* (AT4G17490) 基因則與吉貝素及 *DELLA* 傳導路徑有關，並會透過抑制細胞分裂而產生較小的葉片與植株 (Dubois et al., 2013)。而 *AtERF96* (AT5G43410) 過度表現轉植株會產生較小的葉片，*AtORA59* (AT1G06160) 則是會透過促進細胞分裂而產生較大的葉片等 (Van den Broeck et al., 2017; Wang et al., 2015)。顯示乙烯轉錄因子中的 Group IX 類群基因確實亦有許多調控植物器官大小的文獻報導，然而目前仍針對根、莖、葉等營養器官研究較多，而較少探討這些基因對花朵等繁殖器官生長發育及大小的調控。

4.3 *SsERF-1* 會在短時間內受乙烯刺激而被輕微誘導，但不影響植株對乙烯接收傳遞的敏感性

乙烯反應因子 (ERF) 已知有許多成員會受到乙烯的調控，並參與植物不同發育階段的生長調控，如阿拉伯芥 *AtERF5* 和 *AtERF6* 會受到乙烯促進，並參

與調控植株於逆境下葉片的生長 (Dubois et al., 2013; Skirycz et al., 2011)；水稻 *OsERF1* 會響應乙烯，並促進與乙烯反應有關之下游，參與調控植株生長發育等 (Hu et al., 2008)。於本研究中，大岩桐 *SsERF-I* 會在乙烯前驅物 ACC 處理後短時間內受到輕微促進 (圖八)，顯示其可能參與在乙烯反應的早期階段或較為上游的位置，相似的表現模式亦可在部分過去研究中發現，如玫瑰 *RhERF092* 會在受乙烯處理 1 小時內被高度促進，而該基因會使植株出現生長遲緩、頂端優勢缺失、花序不育等性狀 (Khan et al., 2020)；棉花 (*Gossypium hirsutum*) 的 5 個 GhERF-IXa 子群基因則有 3 個成員基因表現顯示會受到乙烯的促進，並全部都在處理後 1 小時內出現表現上調現象，而後隨著時間增長基因表現則慢慢降低 (Champion et al., 2009)。有趣的是，阿拉伯芥中的同源基因 *AtERF-I* 與同屬 ERF Group IXa 子群的 *AtERF2* 皆是在受乙烯處理後 12 小時才出現表現上升現象 (Fujimoto et al., 2000)，而與上述棉花 GhERF-IXa 子群基因及同屬 ERF Group IXa 子群的大岩桐 *SsERF-I* 表現模式不同，顯示這些基因很可能在演化過程改變其在乙烯反應路徑中的調控位置與功能。此外，大岩桐花苞經 ACC 處理 10 小時後的 *SsERF-I* 表現再度上升，而控制組中期表現則並無明顯差異，除了其可能也參與在乙烯反應路徑中較為下游的位置外，由於實驗進行處理 10 小時後收取樣品時植株正處於黑暗環境，顯示該基因表現及乙烯調控路徑也可能會受到黑暗誘導，使得在含有乙烯的黑暗環境中，植株對乙烯訊號的響應會加劇，進而促進 *SsERF-I* 的表現，而過去文獻亦闡述許多 ERF 基因的表現會受到環境明暗調控，如阿拉伯芥中屬於 ERF 家族成員之一的 *DEWAX* 基因便會受到黑暗誘導，其在莖與葉片中的表現皆會在黑暗處理 3 小時後被促進；除了受到誘導外，亦有研究闡述部分 ERF 基因會受到黑暗抑制，如番茄 *SlERFJ2* 在黑暗環境較光照表現低，並參與調控幼苗下胚軸生長 (Chen et al., 2023)，以上文獻皆顯示 ERF 基因表現可能會受到環境明暗影響，並與光週期有著值得深入探討的調控關聯。

植株對乙烯的接收、傳遞及敏感性會影響其於存在乙烯環境的反應性狀，而此敏感性可透過乙烯三相反應檢驗進行觀察，種子在含有乙烯的黑暗環境中發芽時，幼苗會有較短的根、較短且粗的下胚軸，並產生頂端勾，由於此明顯的性狀差異，便可方便探討特定基因是否影響植株對乙烯接收及反應。而此實驗大部分是應用在對乙烯敏感基因的突變株來進行觀察，如乙烯傳導路徑中的重要基因 *CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE (CTR1)*、*EIN2*、*EIN3*、乙烯受器 *ETR1* 等基因的突變株在存在乙烯或培養基含有乙烯前驅物 ACC 的黑暗環境，皆失去乙烯三相反應性狀，顯示這些基因皆與植株對乙烯的敏感度及反應有著絕對的關聯 (Chang et al., 1993; Chao et al., 1997; Guzman & Ecker, 1990; Kieber et al., 1993)。

然而本篇研究所使用的為異位表達的過度表現轉植株，因此須透過觀察乙烯三相反應性狀的程度差異進行比較，如阿拉伯芥中隸屬於 AP2/ERF 一員的 *AtORA59* 過度表現株，在含乙烯的黑暗環境下生長時可觀察到較野生型短的下胚軸，而突變株則可見較長的下胚軸，顯示該基因會促進植株對乙烯的敏感性 (Kim et al., 2018)，而番茄 *Sl-ERF2* 過度表現株在無乙烯黑暗環境生長亦可見幼苗有較野生型更為彎曲的鉤，番茄 *TERF1* 過度表現株在含乙烯的黑暗環境生長時，有更為劇烈的乙烯三相反應性狀，且在無乙烯黑暗環境生長可同樣觀察到幼苗有更為彎曲的鉤 (Huang et al., 2004; Pirrello et al., 2006)。而本篇實驗利用 *35S:SsERF-1*、*35S:SsERF-1-VP16* 及 *35S:SsERF-1-SRDX* 三種轉植株進行乙烯三相反應檢驗，可見三種轉植株在含乙烯的黑暗環境下生長時皆會產生較短的根、較短且粗的下胚軸及頂端勾等性狀，且於培養基生長的所有幼苗皆無一例外，而透過計算不同轉植株頂端勾的彎曲程度亦無發現明顯趨勢，顯示在 10 μ M ACC 生長環境，*SsERF-1* 基因及其下游的表達似乎並不影響阿拉伯芥植株對於乙烯的接收、傳遞與敏感性，進而使不同轉植株的乙烯三相反應性狀無明顯差異 (圖九 A-B)。

4.4 *SsERF-1* 對植株自營養期進入生殖期時間的調控

35S:*SsERF-1* 及 35S:*SsERF-1*-VP16 轉植株的生長較慢，並會延後植株從營養期進入生殖期的時間，而 35S:*SsERF-1*-SRDX 轉植株則是生長較為快速，並使植株提早進入生殖期，顯示 *SsERF-1* 會減緩植株的生長速度及延後開花的時間 (圖十 A-C)。乙烯以參與調控植物生長周期而為人所知，如葉片及花朵衰老、果實後熟等發育過程，皆在許多物種被證實，其亦被發現與植株自營養期至生殖期的轉變有關，如透過阿拉伯芥乙烯訊息傳導路徑相關基因突變株研究，發現乙烯會促進植株開花 (Ogawara et al., 2003)；而乙烯反應因子調控植株開花時間已有許多過去文獻闡明，如阿拉伯芥 *AtERF12* 基因會透過調控植株的分化以促進花序分生組織 (inflorescence meristem) 至花分生組織 (floral meristem) 的轉變，進一步加速植株開花時間。然而，與上述相反，亦有文獻說明乙烯會透過增加與吉貝素相關的生長抑制蛋白 DELLAs 累積，進而延後阿拉伯芥開花時間 (Achard et al., 2007)。此外，部分乙烯反應因子如阿拉伯芥 *AtERF1* 會顯著延遲植株開花時間，並表明其會在花芽創始 (floral initiation) 時調控 *FLOWERING LOCUS T* 基因，並參與由乙烯前驅物 ACC 誘導的開花時間延後 (Chen et al., 2021)。其他更如阿拉伯芥 *AtERF96* 會延後開花時間、*AtERF019* 會延後開花時間與花朵衰老並增進植株的乾旱耐受度、蝴蝶蘭 *PhaERF25* 會延後開花時間並產生較多花苞、西瓜 (*Citrullus lanatus* subsp. *vulgaris*) *ClERF069* 會延後開花時間及果實後熟等 (Scarpeci et al., 2017; Wang et al., 2015; Zhou et al., 2020; 卓暉皓, 2019)；阿拉伯芥中同樣隸屬於 AP2/ERF 家族 *PUCHI* 基因的突變，導致苞片的不正常生長，並進一步影響花器身分決定，而其在水稻的直系同源基因 *FRIZZY PANICLE* 及玉米中的直系同源基因 *BRANCHED SILKLESS* 皆會阻斷小穗至花期的轉變 (Colombo et al., 1998; Karim et al., 2009; Komatsu et al., 2003)，以上皆顯示乙烯與部分乙烯反應因子皆會參與調控植物的生長周期及營養期至生殖期的轉變，與本篇研究中大岩桐 *SsERF-1* 在阿拉伯芥異位表達的轉植株所觀察到的開花時間改

變密切相關，顯示其對於植株在不同發育時期的轉變很可能扮演著重要的角色。



4.5 *SsERF-1* 對於花瓣大小及花瓣細胞延長的調控

透過 *SsERF-1* 的三個阿拉伯芥異位表達轉植株 35S:*SsERF-1*、35S:*SsERF-1*-VP16 及 35S:*SsERF-1*-SRDX 觀察，過度表現轉植株 35S:*SsERF-1* 及強烈活化下游轉植株 35S:*SsERF-1*-VP16 有相同趨勢的調控性狀，而強烈抑制下游轉植株 35S:*SsERF-1*-SRDX 則反之 (圖十三 A-B、圖十四、圖十五)，顯示 *SsERF-1* 應屬於轉錄活化子，並會透過抑制花瓣細胞的延長進而產生較小的花瓣，參與調控阿拉伯芥轉植株花瓣大小的生長。有許多 *ERF* 基因已被證實與植物器官大小及細胞延長等調控過程有關，如阿拉伯芥 *AtERF19* 會誘導其下游 *Small Auxin Up RNA Gene 32* 並透過促進細胞分裂與延長以調控花器官大小，*AtERF14* 會透過抑制細胞延長進而產生明顯較小的葉片與矮小植株 (Lee et al., 2023; Oñate-Sánchez et al., 2007)；玫瑰 *RhERF092* 會使其轉植株明顯矮小並具有較小葉片，並可發現與抑制細胞延長相關基因如 *AUXIN REGULATED GENE INVOLVED IN ORGAN SIZE*、*SIAMESE* 等表現皆明顯下調；反之，與促進細胞分裂與延長相關基因如 *ANGUSTIFOLIA 3*、*JAGGED*、*CYCD3;1* 及 *CYCD3;2* 皆明顯上調 (Khan et al., 2020)；水稻 *OsEATB* 會下調吉貝素生合成基因，並調控乙烯與吉貝素間的交互作用，進而抑制株高與節間的延長等 (Qi et al., 2011)。此外，細胞延長的過程與細胞壁的調控有關，其透過細胞壁結構改變及疏鬆以擴張並增加細胞面積，而目前已有部分 *ERF* 基因被報導與細胞壁的調控有關，如阿拉伯芥 *ERF* Group III d 成員基因 *ERF34*、*ERF35*、*ERF38* 及 *ERF39*，表現於幼苗細胞分裂、分化較活躍的區域 (如莖頂分生組織、側根和葉原體、毛狀體等)，並可活化與初級細胞壁生合成相關的基因 *CESA*，進而參與細胞壁生合成以適應不同生長發育階段與環境刺激，而初級細胞壁的發育正與生長中的細胞及細胞延長的過程息息相關

(Cosgrove, 2005; Saelim et al., 2019)；阿拉伯芥中屬於 AP2/ERF 轉錄因子一員的 *BOLITA* 基因，於過度表現轉植株會透過抑制細胞延長而產生較小葉片，並由轉錄體差異表現基因分析可見其可能與 *RETINOBLASTOMA-RELATED PROTEIN 1*、*CYCD*、*TCP* 等參與細胞分裂、分化及生長基因有關，更可見與細胞延長調控有關的 *EXPANSIN* 及肌動蛋白細胞骨架重塑相關基因 *ACTIN REMODELING FACTOR 5* 等，更顯示其細胞延長與細胞壁結構成分調控的關聯性 (Marsch-Martinez et al., 2006)；蘿蔔 (*Raphanus sativus* L.) *RsERF40* 會透過促進細胞延長影響主根生長，並會誘導 *RsCESA6* 和 *RsEXPB3* 等細胞壁強化相關基因，使得主根更為強壯 (Li et al., 2023)；而荔枝 (*Litchi chinensis* Sonn.) *LcERF2* 會透過調控細胞壁代謝進而介導果實脫落，並抑制 *UDP-glucose-4-epimerase gene* 而產生較小直徑的花梗，且阿拉伯芥 *LcERF2* 過度表現轉植株生長較遲緩的生長與花瓣容易脫落，更顯示了這些 *ERF* 基因與細胞壁結構修飾的關聯 (Yi et al., 2021)。以上文獻回顧皆說明了 *ERF* 基因與植物器官生長發育、細胞大小調控很可能有著重要的關聯。

4.6 *SsERF-1* 與乙烯對大岩桐背腹側花瓣差異生長的調控模組

由三種 *SsERF-1* 阿拉伯芥轉植株的性狀與野生型 Col-0 比較，可以發現 35S:*SsERF-1* 和 35S:*SsERF-1*-VP16 轉植株有著較為相似的性狀趨勢，而 35S:*SsERF-1*-SRDX 轉植株則有著與前兩者相反之性狀，如 35S:*SsERF-1* 和 35S:*SsERF-1*-VP16 轉植株皆有著較早的開花時間、較矮小的植株及較小花瓣等，而 35S:*SsERF-1*-SRDX 轉植株則反之，由此我們可以初步推測 *SsERF-1* 很可能為一轉錄活化子；然而在多個實驗中，35S:*SsERF-1*-VP16 轉植株卻有較 35S:*SsERF-1* 轉植株輕微的性狀 (圖十、圖十一 A、C)，甚至主莖上的節間長度更與 35S:*SsERF-1* 相反、而與 35S:*SsERF-1*-SRDX 轉植株有相同的傾向 (圖十二 B)，這很可能是因為基因並不一定總是扮演活化子或抑制子的單一轉錄調控

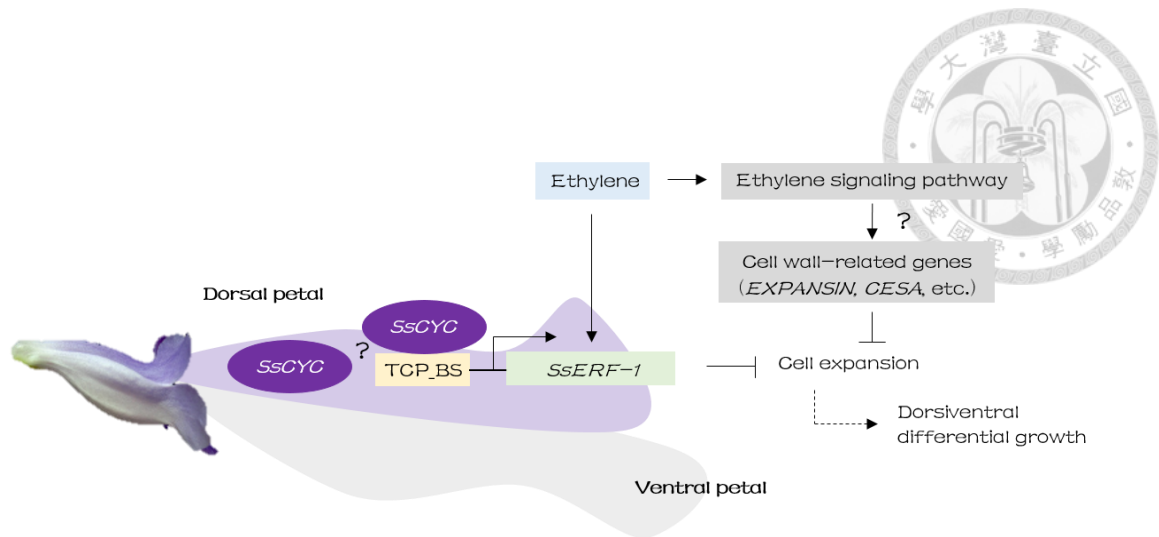
角色，而會根據其作用對象或不同條件而改變調控模式，如阿拉伯芥 TGA 轉錄因子家族會調控 *Pathogenesis-related (PR)* 基因以參與由水楊酸所介導之抗病作用，*TGA2* 被證實可以活化 *PR1* 的表現，而由 *tga2* 單突變轉植株又可發現，在其他 TGA 基因正常表達的情況下 *TGA2* 又可以抑制 *PR1* 及 *PR2* 的表現 (Fan & Dong, 2002; Kang & Klessig, 2005; Kesarwani et al., 2007)；而阿拉伯芥 *ARF17* 在花粉中會促進胼胝質合成基因 *CALLOSE SYNTHASE 5* 以調控花粉細胞壁構造形成，在 *argonaute 1* 突變株根部中卻會抑制 *Auxin-inducible GH3* 以抑制不定根形成 (Sorin et al., 2005; Yang et al., 2013)。以上例子皆說明了同一基因的轉錄功能可能會改變，因此 *SsERF-1* 亦可能有著類似的特性，導致調控不同植株性狀或機制時並不一定總是活化子，使得在阿拉伯芥異位表達之 VP16 顯性活化型轉植株出現性狀被削弱的情況，而得到較不穩定之趨勢。

在兩側對稱大岩桐中，由前人研究已發現背側花瓣較腹側花瓣大、且有較大表皮細胞面積，而 *SsCYC* 則扮演主導花朵兩側對稱性建立的關鍵角色，並會透過調控細胞延長及分裂，使得背腹側花瓣生長成不同形狀及大小，且 *SsERF-1* 很可能便是 *SsCYC* 的潛在下游基因 (Dong et al., 2018; Pan et al., 2022; 王佩琦, 2019)，而本篇研究則發現了 *SsERF-1* 在花朵發育皆於背側花瓣有較高表現，並在阿拉伯芥異位表達轉植株會透過調控細胞延長以抑制花瓣生長大小，這與前述大岩桐背側花瓣較大的背景似乎有些矛盾，這可能是因為性狀的產生與基因的表現位置及複雜的基因交互作用有關，*SsERF-1* 很可能並非均勻表現於整片背側花瓣，而僅表現在特定區域，參與調控花瓣特殊的彎曲形狀，或透過與其他調控基因間的交互作用微調花瓣最終形狀及大小；此外，*SsCYC* 的菸草異位表達轉植株中可發現其會抑制花瓣細胞延長，進而產生較小的花朵 (Pan et al., 2022)，這也代表了同一基因在不同物種中很可能會有著不一樣的調控功能，*SsERF-1* 阿拉伯

芥異位表達中發現其會抑制花瓣細胞延長，並不一定完全反應該基因在原生物種中的功能。



由此我們建立了 *SsERF-1* 及乙烯在大岩桐中對背腹側花瓣差異性生長可能的調控模組，在花朵的發育過程中，主導兩側對稱性建立之關鍵基因 *SsCYC* 會局限在背側花瓣高度表現，並可能透過結合其潛在下游 *SsERF-1* 啟動子上的 TCP 結合位點，進而促進 *SsERF-1* 表現，而 *SsERF-1* 可能會於特定區域表達，進而透過抑制細胞延長使背側花瓣生長出特殊的形狀及大小；另一方面，*SsERF-1* 也會被乙烯促進，而乙烯同樣也可能透過乙烯傳導路徑調控其下游，如其他 *ERF* 基因或細胞壁構造調控相關基因 *EXPANSIN*、*CESA* 等，進而抑制花瓣細胞的延長，這些花瓣細胞的調控機制很可能便共同參與在背腹側花瓣差異性生長及特殊的花型形成中，進一步調控大岩桐花朵兩側對稱性的建立 (圖十六)。



圖十六、*SsCYC* 與 *SsERF-1* 於大岩桐花苞發育過程中可能的調控網絡

大岩桐花苞發育過程中，*SsCYC* 局限於背側花瓣高度表現以建立花朵的兩側對稱性，調控背腹側花瓣性狀差異，而其可能透過與潛在下游基因 *SsERF-1* 啟動子上之 TCP 結合位點結合，進而促進 *SsERF-1* 的表現，而 *SsERF-1* 會透過抑制細胞延長參與調控花瓣形狀及大小的生長，並可能參與調控背側花瓣與腹側花瓣不同花型等性狀之建立；另一方面，*SsERF-1* 之基因表現可被乙烯輕微促進，而乙烯亦可能透過開啟乙烯傳導路徑，調控其下游其他 ERF 及細胞壁構造相關基因如 *EXPANSIN*、*CESA* 等，抑制細胞延長調控花苞的生長發育，顯示乙烯調控路徑也可能為影響大岩桐花苞發育的潛在要素之一。BS 代表結合位點 (binding site)。

第五章 結論與未來展望



對稱性的調控是影響花朵外觀的一大重要性狀，而兩側對稱性的建立在金魚草已被廣泛研究，由 *CYCLOIDEA* (*CYC*) 基因及 *CYC-RAD-DIV* 調控模組主導，然而其他可能也參與調控花朵發育過程龐大性狀差異的潛在基因卻仍尚未明瞭，而大多數物種對稱性建立與花朵性狀調控仍未被闡明。本研究使用非模式物種大岩桐 (*Sinningia speciosa*) 作為實驗材料，並篩選出 *SsCYC* 的潛在下游基因 *SsERF-1*，其屬於乙烯反應因子 (ethylene response factor) 的一員，其在大岩桐花苞發育過程中具有背腹側差異表現，並在背側花瓣表現較高，且其表現可響應乙烯前驅物 ACC 在短時間內被輕微促進。而透過阿拉伯芥異位表達轉植株的建構，發現 *SsERF-1* 會延後轉植株開花時間，調控植株自營養期過渡至生殖期時間，此外，*SsERF-1* 會減緩植株生長速度，亦會產生株高較低、節間較短等性狀；而在花器官上，*SsERF-1* 並不影響花型、花器數量等性狀，但會透過抑制細胞延長進而使植株產生較小花瓣，顯示 *SsERF-1* 可參與調控植株的細胞生長與器官大小等性狀。另一方面，透過將大岩桐花苞進行乙烯前驅物 ACC 處理，可發現乙烯亦會透過抑制細胞延長使花苞較小，顯示乙烯亦可調控大岩桐花苞的生長發育。本篇研究發現大岩桐可能參與調控花朵兩側對稱性差異生長的潛在因子 *SsERF-1*，更探討了植物激素乙烯對大岩桐花苞生長發育的影響，並說明主要的調控效應為透過抑制細胞延長，開啟找尋其他參與花朵兩側對稱性建立的潛在因子及乙烯路徑等可能性 (圖十六)。

本篇研究僅發現 *SsERF-1* 參與調控植株器官大小的可能，然而其與大岩桐花朵兩側對稱性建立的關聯仍尚未明瞭。另一方面，乙烯調控路徑對大岩桐花朵生長發育的影響及調控網絡亦仍有許多待研究之處。未來可針對 *SsCYC* 是否確實透過 *SsERF-1* 啟動子上的 TCP 結合位點以調控其基因表現、*SsERF-1* 與乙

烯訊息傳導路徑間更為詳盡的調控關係、*SsERF-1* 在大岩桐花瓣中確切的表現位置、*SsERF-1* 是否會調控其他與細胞延長相關基因表現以共同影響植株器官生長、乙烯處理對大岩桐花苞生長發育之調控網絡、施加乙烯抑制劑是否確實會得到與乙烯前驅物 ACC 處理相反的結果、檢驗大岩桐花苞背腹側花瓣乙烯含量差異及是否有其他植物激素路徑可參與大岩桐花朵發育與背腹側生長差異等方向進行研究，期望盡早闡明非模式大岩桐花朵兩側對稱性建立的調控模組。

第六章 參考資料



王佩琦 (2019)。大岩桐兩側對稱花中受 CYCLOIDEA 調控之轉錄因子。〔碩士論文。國立臺灣大學〕臺灣博碩士論文知識加值系統。

<https://hdl.handle.net/11296/79fksw>。

卓曄皓 (2019)。蘭科植物中調控花器大小之乙烯轉錄因子(ERF)基因之功能性分析。〔碩士論文。國立中興大學〕臺灣博碩士論文知識加值系統。

<https://hdl.handle.net/11296/8uu77c>。

許巍瀚 (2012)。阿拉伯芥中調控細胞分裂與配子體發育相關基因之功能性分析。

〔博士論文。國立中興大學〕臺灣博碩士論文知識加值系統。

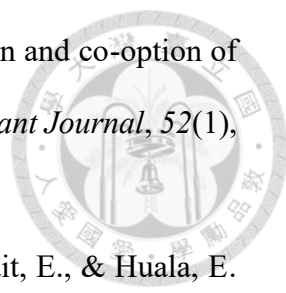
<https://hdl.handle.net/11296/tuje6h>。

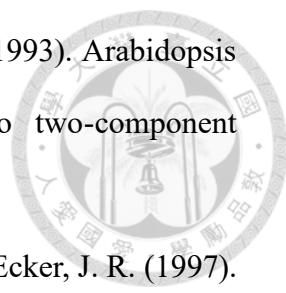
Achard, P., Baghour, M., Chapple, A., Hedden, P., Van Der Straeten, D., Genschik, P., Moritz, T., & Harberd, N. P. (2007). The plant stress hormone ethylene controls floral transition via DELLA-dependent regulation of floral meristem-identity genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(15), 6484-6489.

Adams, D., & Yang, S. (1979). Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(1), 170-174.

Adams, D. O., & Yang, S. F. (1977). Methionine metabolism in apple tissue: implication of S-adenosylmethionine as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Plant Physiology*, 60(6), 892-896.

Ali, S., Charles, T., & Glick, B. (2012). Delay of flower senescence by bacterial endophytes expressing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1139-1144.

- 
- Baxter, C. E., Costa, M. M. R., & Coen, E. S. (2007). Diversification and co-option of RAD-like genes in the evolution of floral asymmetry. *The Plant Journal*, 52(1), 105-113.
- Berardini, T. Z., Reiser, L., Li, D., Mezheritsky, Y., Muller, R., Strait, E., & Huala, E. (2015). The Arabidopsis information resource: making and mining the “gold standard” annotated reference plant genome. *Genesis*, 53(8), 474-485.
- Boller, T., Herner, R. C., & Kende, H. (1979). Assay for and enzymatic formation of an ethylene precursor, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Planta*, 145(3), 293-303.
- Camprubi, P., & Nichols, R. (1979). Ethylene-induced growth of petals and styles in the immature carnation inflorescence. *Journal of Horticultural Science*, 54(3), 225-228.
- Chaabouni, S., Jones, B., Delalande, C., Wang, H., Li, Z., Mila, I., Frasse, P., Latche, A., Pech, J.-C., & Bouzayen, M. (2009). *Sl-IAA3*, a tomato Aux/IAA at the crossroads of auxin and ethylene signalling involved in differential growth. *Journal of Experimental Botany*, 60(4), 1349-1362.
- Champion, A., Hebrard, E., Parra, B., Bournaud, C., Marmey, P., Tranchant, C., & Nicole, M. (2009). Molecular diversity and gene expression of cotton ERF transcription factors reveal that group IXa members are responsive to jasmonate, ethylene and Xanthomonas. *Molecular Plant Pathology*, 10(4), 471-485.
- Chandler, J., & Werr, W. (2020). A phylogenetically conserved APETALA2/ethylene response factor, *ERF12*, regulates arabidopsis floral development. *Plant Molecular Biology*, 102(1), 39-54.
- Chandler, J. W. (2018). Class VIIIb APETALA2 ethylene response factors in plant development. *Trends in Plant Science*, 23(2), 151-162.

- 
- Chang, C., Kwok, S. F., Bleecker, A. B., & Meyerowitz, E. M. (1993). Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. *Science*, 262(5133), 539-544.
- Chao, Q., Rothenberg, M., Solano, R., Roman, G., Terzaghi, W., & Ecker, J. R. (1997). Activation of the ethylene gas response pathway in Arabidopsis by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell*, 89(7), 1133-1144.
- Chen, C., Hussain, N., Wang, Y., Li, M., Liu, L., Qin, M., Ma, N., Gao, J., & Sun, X. (2020). An ethylene-inhibited NF-YC transcription factor RhNF-YC9 regulates petal expansion in rose. *Horticultural Plant Journal*, 6(6), 419-427.
- Chen, Y., Yang, H., Tang, B., Li, F., Xie, Q., Chen, G., & Hu, Z. (2023). The AP2/ERF transcription factor SIERF. J2 functions in hypocotyl elongation and plant height in tomato. *Plant Cell Reports*, 42(2), 371-383.
- Chen, Y., Zhang, L., Zhang, H., Chen, L., & Yu, D. (2021). ERF1 delays flowering through direct inhibition of FLOWERING LOCUS T expression in Arabidopsis. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63(10), 1712-1723.
- Cheng, C., Yu, Q., Wang, Y., Wang, H., Dong, Y., Ji, Y., Zhou, X., Li, Y., Jiang, C.-Z., & Gan, S.-S. (2021). Ethylene-regulated asymmetric growth of the petal base promotes flower opening in rose (*Rosa hybrida*). *The Plant Cell*, 33(4), 1229-1251.
- Colombo, L., Marziani, G., Masiero, S., Wittich, P. E., Schmidt, R. J., Gorla, M. S., & Pe, M. E. (1998). *BRANCHED SILKLESS* mediates the transition from spikelet to floral meristem during *Zea mays* ear development. *The Plant Journal*, 16(3), 355-363.
- Corley, S. B., Carpenter, R., Copsey, L., & Coen, E. (2005). Floral asymmetry involves

- an interplay between TCP and MYB transcription factors in *Antirrhinum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(14), 5068-5073.
- Cosgrove, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(11), 850-861.
- Costa, M. M. R., Fox, S., Hanna, A. I., Baxter, C., & Coen, E. (2005). Evolution of regulatory interactions controlling floral asymmetry. *Development (Cambridge, England)*, 132(22), 5093–5101.
- Cox, M. C., Millenaar, F. F., Van Berkel, Y. E. d. J., Peeters, A. J., & Voesenek, L. A. (2003). Plant movement. Submergence-induced petiole elongation in *Rumex palustris* depends on hyponastic growth. *Plant Physiology*, 132(1), 282-291.
- Danisman, S. (2016). TCP transcription factors at the interface between environmental challenges and the plant's growth responses. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1930.
- Dietz, K.-J., Vogel, M. O., & Viehhauser, A. (2010). AP2/EREBP transcription factors are part of gene regulatory networks and integrate metabolic, hormonal and environmental signals in stress acclimation and retrograde signalling. *Protoplasma*, 245(1), 3-14.
- Dong, Y., Liu, J., Li, P.-W., Li, C.-Q., Lü, T.-F., Yang, X., & Wang, Y.-Z. (2018). Evolution of Darwin's peloric gloxinia (*Sinningia speciosa*) is caused by a null mutation in a pleiotropic TCP gene. *Molecular Biology and Evolution*, 35(8), 1901-1915.
- Dubois, M., Skirycz, A., Claeys, H., Maleux, K., Dhondt, S., De Bodt, S., Vanden Bossche, R., De Milde, L., Yoshizumi, T., & Matsui, M. (2013). ETHYLENE RESPONSE FACTOR6 acts as a central regulator of leaf growth under water-limiting conditions in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 162(1), 319-332.
- Dubois, M., Van den Broeck, L., & Inzé, D. (2018). The pivotal role of ethylene in plant

growth. *Trends in Plant Science*, 23(4), 311-323.

Etchells, J. P., Provost, C. M., & Turner, S. R. (2012). Plant vascular cell division is maintained by an interaction between PXY and ethylene signalling. *PLoS Genetics*, 8(11), e1002997.

Fan, W., & Dong, X. (2002). In vivo interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 14(6), 1377-1389.

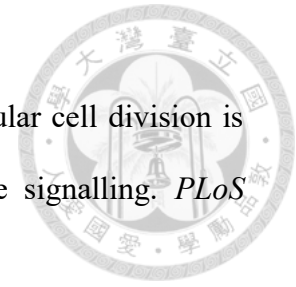
Feng, G., Liu, G., & Xiao, J. (2015). The Arabidopsis EIN2 restricts organ growth by retarding cell expansion. *Plant Signaling & Behavior*, 10(5), e1017169.

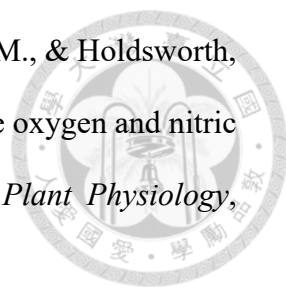
Feng, J.-X., Liu, D., Pan, Y., Gong, W., Ma, L.-G., Luo, J.-C., Deng, X. W., & Zhu, Y.-X. (2005). An annotation update via cDNA sequence analysis and comprehensive profiling of developmental, hormonal or environmental responsiveness of the Arabidopsis AP2/EREBP transcription factor gene family. *Plant Molecular Biology*, 59(6), 853-868.

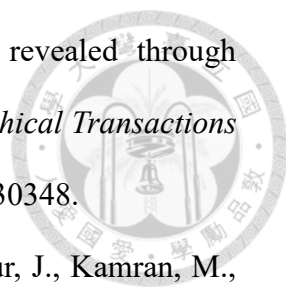
Fiorani, F., Bogemann, G. M., Visser, E. J., Lambers, H., & Voesenek, L. A. (2002). Ethylene emission and responsiveness to applied ethylene vary among *Poa* species that inherently differ in leaf elongation rates. *Plant Physiology*, 129(3), 1382-1390.

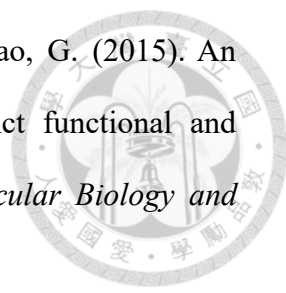
Fujimoto, S. Y., Ohta, M., Usui, A., Shinshi, H., & Ohme-Takagi, M. (2000). Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *The Plant Cell*, 12(3), 393-404.

Garcês, H. M. P., Spencer, V. M., & Kim, M. (2016). Control of floret symmetry by *RAY3*, *SvDIV1B*, and *SvRAD* in the capitulum of *Senecio vulgaris*. *Plant Physiology*, 171(3), 2055-2068.



- 
- Gibbs, D. J., Conde, J. V., Berckhan, S., Prasad, G., Mendiondo, G. M., & Holdsworth, M. J. (2015). Group VII ethylene response factors coordinate oxygen and nitric oxide signal transduction and stress responses in plants. *Plant Physiology*, 169(1), 23-31.
- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3), 307-321.
- Guo, H., & Ecker, J. R. (2004). The ethylene signaling pathway: new insights. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(1), 40-49.
- Guzman, P., & Ecker, J. R. (1990). Exploiting the triple response of Arabidopsis to identify ethylene-related mutants. *The Plant Cell*, 2(6), 513-523.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Hamilton, A., Bouzayen, M., & Grierson, D. (1991). Identification of a tomato gene for the ethylene-forming enzyme by expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(16), 7434-7437.
- Harrison, S. J., Mott, E. K., Parsley, K., Aspinall, S., Gray, J. C., & Cottage, A. (2006). A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation. *Plant Methods*, 2(1), 1-7.
- He, P., Warren, R. F., Zhao, T., Shan, L., Zhu, L., Tang, X., & Zhou, J.-M. (2001). Overexpression of *Pti5* in tomato potentiates pathogen-induced defense gene expression and enhances disease resistance to *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14(12), 1453-1457.

- 
- Hileman, L. C. (2014). Trends in flower symmetry evolution revealed through phylogenetic and developmental genetic advances. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1648), 20130348.
- Hoang, N. V., Choe, G., Zheng, Y., Fandino, A. C. A., Sung, I., Hur, J., Kamran, M., Park, C., Kim, H., & Ahn, H. (2020). Identification of conserved gene-regulatory networks that integrate environmental sensing and growth in the root cambium. *Current Biology*, 30(15), 2887-2900. e2887.
- Hsu, H.-J., He, C.-W., Kuo, W.-H., Hsin, K.-T., Lu, J.-Y., Pan, Z.-J., & Wang, C.-N. (2018). Genetic analysis of floral symmetry transition in African violet suggests the involvement of trans-acting factor for *CYCLOIDEA* expression shifts. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1008.
- Hu, Y., Zhao, L., Chong, K., & Wang, T. (2008). Overexpression of *OsERF1*, a novel rice ERF gene, up-regulates ethylene-responsive genes expression besides affects growth and development in Arabidopsis. *Journal of Plant Physiology*, 165(16), 1717-1725.
- Huang, G., Han, M., Jian, L., Chen, Y., Sun, S., Wang, X., & Wang, Y. (2020). An ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 protein directly targets the *GEG* promoter and mediates ethylene-induced ray petal elongation in *Gerbera hybrida*. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1737.
- Huang, Z., Zhang, Z., Zhang, X., Zhang, H., Huang, D., & Huang, R. (2004). Tomato TERF1 modulates ethylene response and enhances osmotic stress tolerance by activating expression of downstream genes. *Febs Letters*, 573(1-3), 110-116.
- Jia, Y., Chen, C., Gong, F., Jin, W., Zhang, H., Qu, S., Ma, N., Jiang, Y., Gao, J., & Sun, X. (2022). An Aux/IAA Family Member, *RhIAA14*, Involved in Ethylene-Inhibited Petal Expansion in Rose (*Rosa hybrida*). *Genes*, 13(6), 1041.

- 
- Jin, J., He, K., Tang, X., Li, Z., Lv, L., Zhao, Y., Luo, J., & Gao, G. (2015). An Arabidopsis transcriptional regulatory map reveals distinct functional and evolutionary features of novel transcription factors. *Molecular Biology and Evolution*, 32(7), 1767-1773.
- Jin, J., Tian, F., Yang, D.-C., Meng, Y.-Q., Kong, L., Luo, J., & Gao, G. (2016). PlantTFDB 4.0: toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D1040–D1045.
- Jin, J., Zhang, H., Kong, L., Gao, G., & Luo, J. (2014). PlantTFDB 3.0: a portal for the functional and evolutionary study of plant transcription factors. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D1182-D1187.
- Johnson, P. R., & Ecker, J. R. (1998). The ethylene gas signal transduction pathway: a molecular perspective. *Annual Review of Genetics*, 32(1), 227-254.
- Ju, C., & Chang, C. (2015). Mechanistic insights in ethylene perception and signal transduction. *Plant Physiology*, 169(1), 85-95.
- Kang, H.-G., & Klessig, D. F. (2005). Salicylic acid-inducible Arabidopsis CK2-like activity phosphorylates TGA2. *Plant Molecular Biology*, 57, 541-557.
- Karim, M. R., Hirota, A., Kwiatkowska, D., Tasaka, M., & Aida, M. (2009). A role for Arabidopsis *PUCHI* in floral meristem identity and bract suppression. *The Plant Cell*, 21(5), 1360-1372.
- Kesarwani, M., Yoo, J., & Dong, X. (2007). Genetic interactions of TGA transcription factors in the regulation of pathogenesis-related genes and disease resistance in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 144(1), 336-346.
- Khan, M. A., Imtiaz, M., Hussain, A., Jalal, F., Hayat, S., Hussain, S., Said, F., Alam, M., & Amir, R. (2020). Isolation and functional characterization of an Ethylene Response Factor (RhERF092) from rose (*Rosa hybrida*). *Plant Cell, Tissue and*

Organ Culture (PCTOC), 140, 157-172.

Khaskheli, A. J., Ahmed, W., Ma, C., Zhang, S., Liu, Y., Li, Y., Zhou, X., & Gao, J. (2018). RhERF113 functions in ethylene-induced petal senescence by modulating cytokinin content in rose. *Plant and Cell Physiology*, 59(12), 2442-2451.

Kieber, J. J., Rothenberg, M., Roman, G., Feldmann, K. A., & Ecker, J. R. (1993). *CTR1*, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell*, 72(3), 427-441.

Kim, N. Y., Jang, Y. J., & Park, O. K. (2018). AP2/ERF family transcription factors ORA59 and RAP2. 3 interact in the nucleus and function together in ethylene responses. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1675.

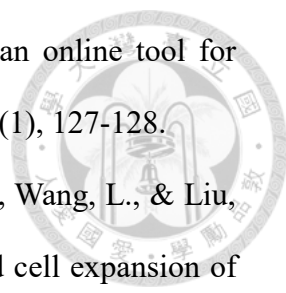
Komatsu, M., Chujo, A., Nagato, Y., Shimamoto, K., & Kyojuka, J. (2003). *FRIZZY PANICLE* is required to prevent the formation of axillary meristems and to establish floral meristem identity in rice spikelets. *Development (Cambridge, England)*, 130(16), 3841–3850.

Kong, J., Lau, S., & Jürgens, G. (2015). Twin plants from supernumerary egg cells in Arabidopsis. *Current Biology*, 25(2), 225-230.

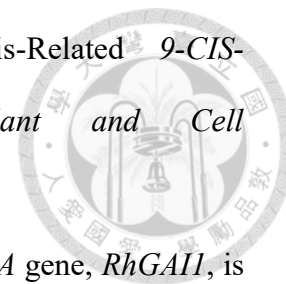
Lampugnani, E. R., Kilinc, A., & Smyth, D. R. (2013). Auxin controls petal initiation in Arabidopsis. *Development*, 140(1), 185-194.

Lee, P. F., Zhan, Y. X., Wang, J. C., Cheng, Y. H., Hsu, W. H., Hsu, H. F., Chen, W. H., & Yang, C. H. (2023). The *AtERF19* gene regulates meristem activity and flower organ size in plants. *The Plant Journal : for cell and molecular biology*, 114(6), 1338–1352.

Lee, S. H., & Reid, D. M. (1997). The role of endogenous ethylene in the expansion of *Helianthus annuus* leaves. *Canadian Journal of Botany*, 75(3), 501-508.

- 
- Letunic, I., & Bork, P. (2007). Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics*, 23(1), 127-128.
- Li, C., Mao, B., Wang, K., Xu, L., Fan, L., Wang, Y., Li, Y., Ma, Y., Wang, L., & Liu, L. (2023). *RsERF40* contributes to cold stress tolerance and cell expansion of taproot in radish (*Raphanus sativus* L.). *Horticulture Research*, 10(3), uhad013.
- Li, H., Wang, Y., Wu, M., Li, L., Li, C., Han, Z., Yuan, J., Chen, C., Song, W., & Wang, C. (2017). Genome-wide identification of AP2/ERF transcription factors in cauliflower and expression profiling of the ERF family under salt and drought stresses. *Frontiers in Plant Science*, 8, 946.
- Li, J., Wang, Y., Zhang, Y., Wang, W., Irish, V. F., & Huang, T. (2016). *RABBIT EARS* regulates the transcription of *TCP4* during petal development in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 67(22), 6473-6480.
- Li, N., Huang, B., Tang, N., Jian, W., Zou, J., Chen, J., Cao, H., Habib, S., Dong, X., & Wei, W. (2017). The MADS-box gene *SIMBP21* regulates sepal size mediated by ethylene and auxin in tomato. *Plant and Cell Physiology*, 58(12), 2241-2256.
- Licausi, F., Ohme-Takagi, M., & Perata, P. (2013). APETALA 2/Ethylene Responsive Factor (AP 2/ERF) transcription factors: Mediators of stress responses and developmental programs. *New Phytologist*, 199(3), 639-649.
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sánchez-Serrano, J. J., & Solano, R. (2003). ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *The Plant Cell*, 15(1), 165-178.
- Luo, D., Carpenter, R., Copsey, L., Vincent, C., Clark, J., & Coen, E. (1999). Control of organ asymmetry in flowers of *Antirrhinum*. *Cell*, 99(4), 367-376.
- Luo, J., Chen, S., Cao, S., Zhang, T., Li, R., Chan, Z., & Wang, C. (2021). Rose (*Rosa hybrida*) Ethylene Responsive Factor 3 Promotes Rose Flower Senescence via

Direct Activation of The Absciscic Acid Synthesis-Related 9-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE Gene. *Plant and Cell Physiology*, 62(6), 1030–1043.



Luo, J., Ma, N., Pei, H., Chen, J., Li, J., & Gao, J. (2013). A *DELLA* gene, *RhGAIL*, is a direct target of EIN3 and mediates ethylene-regulated rose petal cell expansion via repressing the expression of *RhCesA2*. *Journal of Experimental Botany*, 64(16), 5075-5084.

Mao, J.-L., Miao, Z.-Q., Wang, Z., Yu, L.-H., Cai, X.-T., & Xiang, C.-B. (2016). Arabidopsis ERF1 mediates cross-talk between ethylene and auxin biosynthesis during primary root elongation by regulating *ASA1* expression. *PLoS Genetics*, 12(1), e1005760.

Marsch-Martinez, N., Greco, R., Becker, J. D., Dixit, S., Bergervoet, J. H., Karaba, A., de Folter, S., & Pereira, A. (2006). *BOLITA*, an Arabidopsis AP2/ERF-like transcription factor that affects cell expansion and proliferation/differentiation pathways. *Plant Molecular Biology*, 62, 825-843.

Martín-Trillo, M., & Cubas, P. (2010). TCP genes: a family snapshot ten years later. *Trends in Plant Science*, 15(1), 31-39.

Merchante, C., & Stepanova, A. N. (2017). The triple response assay and its use to characterize ethylene mutants in Arabidopsis. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1573, 163–209.

Mizoi, J., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012). AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2), 86-96.

Naing, A. H., Soe, M. T., Yeum, J. H., & Kim, C. K. (2021). Ethylene acts as a negative regulator of the stem-bending mechanism of different cut snapdragon cultivars.

Frontiers in Plant Science, 12, 745038.

Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T., & Shinshi, H. (2006). Genome-wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and rice. *Plant Physiology*, 140(2), 411-432.

Neljubow, D. (1901). Über die horizontale Nutation der Stengel von Pisum Sativum und einiger anderen Planzen. *Bot. Centralbl. Beih.*, 10, 128-139.

Oñate-Sánchez, L., & Singh, K. B. (2002). Identification of Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors with distinct induction kinetics after pathogen infection. *Plant Physiology*, 128(4), 1313-1322.

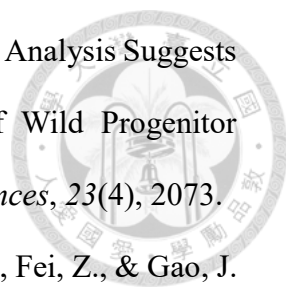
Oñate-Sánchez, L., Anderson, J. P., Young, J., & Singh, K. B. (2007). AtERF14, a member of the ERF family of transcription factors, plays a nonredundant role in plant defense. *Plant Physiology*, 143(1), 400-409.

Ogawara, T., Higashi, K., Kamada, H., & Ezura, H. (2003). Ethylene advances the transition from vegetative growth to flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology*, 160(11), 1335-1340.

Olmedo, G., Guo, H., Gregory, B. D., Nourizadeh, S. D., Aguilar-Henonin, L., Li, H., An, F., Guzman, P., & Ecker, J. R. (2006). *ETHYLENE-INSENSITIVE5* encodes a 5'→ 3' exoribonuclease required for regulation of the EIN3-targeting F-box proteins EBF1/2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(36), 13286-13293.

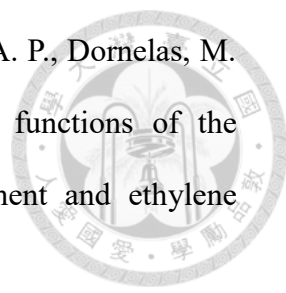
Owji, H., Hajiebrahimi, A., Seradj, H., & Hemmati, S. (2017). Identification and functional prediction of stress responsive AP2/ERF transcription factors in *Brassica napus* by genome-wide analysis. *Computational Biology and Chemistry*, 71, 32-56.

Pan, Z.-J., Nien, Y.-C., Shih, Y.-A., Chen, T.-Y., Lin, W.-D., Kuo, W.-H., Hsu, H.-C.,

- 
- Tu, S.-L., Chen, J.-C., & Wang, C.-N. (2022). Transcriptomic Analysis Suggests Auxin Regulation in Dorsal-Ventral Petal Asymmetry of Wild Progenitor *Sinningia speciosa*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2073.
- Pei, H., Ma, N., Tian, J., Luo, J., Chen, J., Li, J., Zheng, Y., Chen, X., Fei, Z., & Gao, J. (2013). An NAC transcription factor controls ethylene-regulated cell expansion in flower petals. *Plant Physiology*, 163(2), 775-791.
- Philosoph-Hadas, S., Meir, S., Rosenberger, I., & Halevy, A. H. (1996). Regulation of the gravitropic response and ethylene biosynthesis in gravistimulated snapdragon spikes by calcium chelators and ethylene inhibitors. *Plant Physiology*, 110(1), 301-310.
- Pierik, R., Sasidharan, R., & Voesenek, L. A. (2007). Growth control by ethylene: adjusting phenotypes to the environment. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26(2), 188-200.
- Pierik, R., Visser, E. J., de Kroon, H., & Voesenek, L. A. (2003). Ethylene is required in tobacco to successfully compete with proximate neighbours. *Plant, Cell & Environment*, 26(8), 1229-1234.
- Pirrello, J., Jaimes-Miranda, F., Sanchez-Ballesta, M. T., Tournier, B., Khalil-Ahmad, Q., Regad, F., Latche, A., Pech, J. C., & Bouzayen, M. (2006). Sl-ERF2, a tomato ethylene response factor involved in ethylene response and seed germination. *Plant and Cell Physiology*, 47(9), 1195-1205.
- Qi, W., Sun, F., Wang, Q., Chen, M., Huang, Y., Feng, Y.-Q., Luo, X., & Yang, J. (2011). Rice ethylene-response AP2/ERF factor *OsEATB* restricts internode elongation by down-regulating a gibberellin biosynthetic gene. *Plant Physiology*, 157(1), 216-228.
- Qu, X., Hall, B. P., Gao, Z., & Schaller, G. E. (2007). A strong constitutive ethylene-

- response phenotype conferred on *Arabidopsis* plants containing null mutations in the ethylene receptors *ETR1* and *ERS1*. *BMC Plant Biology*, 7(1), 1-15.
- Rong, W., Qi, L., Wang, A., Ye, X., Du, L., Liang, H., Xin, Z., & Zhang, Z. (2014). The ERF transcription factor TaERF 3 promotes tolerance to salt and drought stresses in wheat. *Plant Biotechnology Journal*, 12(4), 468-479.
- Saelim, L., Akiyoshi, N., Tan, T. T., Ihara, A., Yamaguchi, M., Hirano, K., Matsuoka, M., Demura, T., & Ohtani, M. (2019). *Arabidopsis* Group III ER proteins positively regulate primary cell wall-type CESA genes. *Journal of Plant Research*, 132, 117-129.
- Sargent, R. D. (2004). Floral symmetry affects speciation rates in angiosperms. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 271(1539), 603-608.
- Scarpeci, T. E., Freja, V. S., Zanol, M. I., & Valle, E. M. (2017). Overexpression of *AtERF019* delays plant growth and senescence, and improves drought tolerance in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 68(3), 673-685.
- Skirycz, A., Claeys, H., De Bodt, S., Oikawa, A., Shinoda, S., Andrianakaja, M., Maleux, K., Eloy, N. B., Coppens, F., & Yoo, S.-D. (2011). Pause-and-stop: the effects of osmotic stress on cell proliferation during early leaf development in *Arabidopsis* and a role for ethylene signaling in cell cycle arrest. *The Plant Cell*, 23(5), 1876-1888.
- Soe, M. T., Naing, A. H., Kim, S. R., & Kim, C. K. (2022). Characterizing the effects of different chemicals on stem bending of cut snapdragon flower. *Plant Methods*, 18(1), 1-10.
- Solano, R., Stepanova, A., Chao, Q., & Ecker, J. R. (1998). Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3

- and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes & Development*, 12(23), 3703-3714.
- Sorin, C., Bussell, J. D., Camus, I., Ljung, K., Kowalczyk, M., Geiss, G., McKham, H., Garcion, C., Vaucheret, H., & Sandberg, G. (2005). Auxin and light control of adventitious rooting in *Arabidopsis* require ARGONAUTE1. *The Plant Cell*, 17(5), 1343-1359.
- Spencer, V., & Kim, M. (2018). Re “CYC” ling molecular regulators in the evolution and development of flower symmetry. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 79, 16–26.
- Takeda, S., Matsumoto, N., & Okada, K. (2004). *RABBIT EARS*, encoding a SUPERMAN-like zinc finger protein, regulates petal development in *Arabidopsis thaliana*. *Development (Cambridge, England)*, 131(2), 425–434.
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022-3027.
- Tian, F., Yang, D.-C., Meng, Y.-Q., Jin, J., & Gao, G. (2020). PlantRegMap: charting functional regulatory maps in plants. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D1104-D1113.
- Trivellini, A., Ferrante, A., Vernieri, P., & Serra, G. (2011). Effects of abscisic acid on ethylene biosynthesis and perception in *Hibiscus rosa-sinensis* L. flower development. *Journal of Experimental Botany*, 62(15), 5437-5452.
- Van den Broeck, L., Dubois, M., Vermeersch, M., Storme, V., Matsui, M., & Inzé, D. (2017). From network to phenotype: the dynamic wiring of an *Arabidopsis* transcriptional network induced by osmotic stress. *Molecular Systems Biology*, 13(12), 961.

- 
- van Es, S. W., Silveira, S. R., Rocha, D. I., Bimbo, A., Martinelli, A. P., Dornelas, M. C., Angenent, G. C., & Immink, R. G. (2018). Novel functions of the Arabidopsis transcription factor *TCP5* in petal development and ethylene biosynthesis. *The Plant Journal*, 94(5), 867-879.
- Ververidis, P., & John, P. (1991). Complete recovery in vitro of ethylene-forming enzyme activity. *Phytochemistry*, 30(3), 725-727.
- Voesenek, L., & Blom, C. (1989). Growth responses of Rumex species in relation to submergence and ethylene. *Plant, Cell & Environment*, 12(4), 433-439.
- Wang, K. L.-C., Li, H., & Ecker, J. R. (2002). Ethylene biosynthesis and signaling networks. *The Plant Cell*, 14(suppl_1), S131-S151.
- Wang, X., Liu, S., Tian, H., Wang, S., & Chen, J.-G. (2015). The small ethylene response factor ERF96 is involved in the regulation of the abscisic acid response in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1064.
- Wang, X., Meng, H., Tang, Y., Zhang, Y., He, Y., Zhou, J., & Meng, X. (2022). Phosphorylation of an ethylene response factor by MPK3/MPK6 mediates negative feedback regulation of pathogen-induced ethylene biosynthesis in Arabidopsis. *Journal of Genetics and Genomics*, 49(8), 810-822.
- Wilkinson, L. G., & Tucker, M. R. (2017). An optimised clearing protocol for the quantitative assessment of sub-epidermal ovule tissues within whole cereal pistils. *Plant Methods*, 13(1), 1-10.
- Yang, H., Sun, Y., Wang, H., Zhao, T., Xu, X., Jiang, J., & Li, J. (2021). Genome-wide identification and functional analysis of the *ERF2* gene family in response to disease resistance against *Stemphylium lycopersici* in tomato. *BMC Plant Biology*, 21, 1-13.
- Yang, J., Tian, L., Sun, M.-X., Huang, X.-Y., Zhu, J., Guan, Y.-F., Jia, Q.-S., & Yang,

- Z.-N. (2013). AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for pollen wall pattern formation in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 162(2), 720-731.
- Yi, J. W., Wang, Y., Ma, X. S., Zhang, J. Q., Zhao, M. L., Huang, X. M., Li, J. G., Hu, G. B., & Wang, H. C. (2021). *LcERF2* modulates cell wall metabolism by directly targeting a UDP-glucose-4-epimerase gene to regulate pedicel development and fruit abscission of litchi. *The Plant Journal*, 106(3), 801-816.
- Yingjie, S., Xinyue, Z., Yaping, J., Jihan, W., Bingru, L., Xinhua, Z., Xiaolan, L., & Fujun, L. (2022). Roles of ERF2 in apple fruit cuticular wax synthesis. *Scientia Horticulturae*, 301, 111144.
- Zhang, X., Henriques, R., Lin, S.-S., Niu, Q.-W., & Chua, N.-H. (2006). Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana using the floral dip method. *Nature protocols*, 1(2), 641-646.
- Zhong, J., Preston, J. C., Hileman, L. C., & Kellogg, E. A. (2017). Repeated and diverse losses of corolla bilateral symmetry in the Lamiaceae. *Annals of Botany*, 119(7), 1211-1223.
- Zhou, M., Guo, S., Tian, S., Zhang, J., Ren, Y., Gong, G., Li, C., Zhang, H., & Xu, Y. (2020). Overexpression of the watermelon ethylene response factor *CIERF069* in transgenic tomato resulted in delayed fruit ripening. *Horticultural Plant Journal*, 6(4), 247-256.
- Zhou, Y., Memelink, J., & Linthorst, H. (2018). AP/ERF and WRKY transcription factors involved in the coordinated regulation of the salicylic acid signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Exploring Novel Regulators and Enzymes in Salicylic Acid-mediated Plant Defense*, 35.

第七章 圖表附錄



附錄表一、*SsERF-1* 與 *SsCYC* 之 編碼序列 (CDS) 全長

>*SsERF-1*

ATGTACCAGCCAATTTTCAGTGAGTTAACGCCGGTGGATTGTGCGCCGGTG
GTTTACCAGAGCTCGAGTTTCAGCAGTCTGGTGCCATTTTGTACGGAACT
TGGGGAGACTTGCCGTTAAAAGTTGATGATTTCGGAAGATATGGTAATTTGC
GGTCTATTGCGTGACGCGGTTAATGATGGATGGACGCCGTTTAAACAACGTG
AAACCCAAGACGAGATGTAAAATTGAGCCGGAGCCGAGCCTATCCGCGGT
GAAAACGGAATACGTGAGTTCTCCGCCGGAGATGACCGCGCCGGCGTTGG
CGCGGCCTAAAGGAAGGCACTACAGAGGAGTGAGGCAGCGTCCGTGGGG
GAAATTTGCAGCCGAGATAAGAGACCCGGCTAAAAATGGTGCAAGAGTTT
GGCTTGGAACATATGAAACGGCTGAAGAAGCGGCTTCTGCTTACGACAGA
GCGGCTTACAGAATGCGTGGATCAAAGGCTCTATTGAATTTTCCTCATAAAA
TTGGCTTAAATGAGCCGGAGCCGGTGAGGGCGACGGCCAAGAGGCGGTCA
CCGGAAGTACCTTCTTCCACAGTTTCGACCGTCTCATCCGGCTCCGATAGT
GGCTCTCCGAAGCGGAGGAAGAGAGGGGCAGCGGCTGAGCAAGCCGAAT
TAGAAGTGGAGAGCCGATCCAATTTGCATAACGTTAAATACCACATGACAA
TGTTGCCACATGGTGAACAACACTATTGGTGGTTTGA

>SsCYC

ATGTTTAGCAAGAGCACATACCTTCATGTTCCACAGGTTTCACCATCTCTTC
AATCTCGTGCCTCTACTTCTTTGGTTGACCTTAATGGAGGTGAAATCTTGCT
TCATAACCACCACCACCATGACATGCTTTCCAGCCATTACTTAGCCGTGAAT
GCCCCGTTTCTTGAGGCTTCCTCCTTGTATAACCAAGATGCTATTGTTGGTC
TAAATGAAGATCCTTCTGCCATGGCCAACACGTTTCCAAGGAAGCAAACAG
TGAAAAAAGATAGGCACAGTAAAATTGTTACAGCTCAAGGGCCGAGGGAT
CGGAGAGTCAGGCTTTCTATTGGCATAGCAAGAAAGTTCTTTGATCTTCAA
GAAATGCTAGGTTTTGACAAGCCAAGTAAAACCCTTGACTGGTTGCTCACC
AAATCTAAAGCAGCCATTAAGGAGCTAGTGCAGGCTAAGAAAAGTGGGAG
TGGGAGTGCTAAGAGCATTCTTCCCCTTCTGAATGCGAGGTAGTGTCTGC
AGGAAATGGTGAACTTTCGAAAATGGCAGCTATTTGGATGTGGAATCAAA
GAAGAAATCACTGCCCCCTGAATCCTAATTACAAGTGTAAGAATATTCAAA
AGATCCACAGCAGTCTGCATTAAATCTTGCAAAAGTATCAAGGGCTAAGGC
AAGAGCAAGGGCCAGAGAAAGAACAAGAGAGAAAATGTGCATCAAGAAG
CTTAATGAATCAAGAAGCATGGATCCTGATTTGAACCCTTCAAACCAAATTC
AGCCGACCCTCCACTGTCCCTTAATAATAATGTACCTGCTGCAACAACCTG
AAGATTTAATTCAAGAATCCATTGTCATTAAAAGGATGTTGAAACAGTACCC
TTCATTTTTTTGGATTTCAACAAAACCTTATCATTTCAGGGATTTGAACTGC
AATCTCCCTTCTCCTAATATCAACGATAATTGGGATATCAATAGCTTAACCTC
ACAATCCAACCTGTGTGACATTTTGGATCAGCACAAGTTCATGAATAGCTCT
TCAAATATATAG



附錄表二、*SsERF-1* 阿拉伯芥轉殖株構築之引子表

引子名稱	序列	用途
SsERF1_F_r	ACGTAACTGCAGATGTACCAGCCAATTTTC	自大岩桐花瓣 cDNA 中擴增 <i>SsERF-1</i> (含 PstI 切位)
SsERF1_R_r	TGCTTAGGATCCAACCACCAATAGTTGTTC	自大岩桐花瓣 cDNA 中擴增 <i>SsERF-1</i> (含 BamHI 切位)
TMV_omega	CCAACAACAACAAACAA	位於載體上的前置引子 (Forward primer) 以確認轉殖株中是否帶有轉殖載體
mGFP-2	TCAACAAGAATTGGGACAACCTCCACAAACAA	位於 pEpyon-22K 與 pEpyon-2aK 載體上的反置引子 (Reverse primer) 以確認轉殖株中是否帶有轉殖載體
VP16-rev	GAGCTCTACCCACCGTACTCGTCAATTC	位於 pEpyon-2bK 載體上的反置引子 (Reverse primer) 以確認轉殖株中是否帶有轉殖載體



附錄表三、以 RT-PCR 及 qRT-PCR 測量基因表現之引子表

引子名稱	序列	用途
SsACT7_qp_F	TCCAGGCTGTATTGTCTCTTTACG	檢測大岩桐管家基因 SsACT7 表現之 qRT-PCR 引子
SsACT7_qp_R	GGCATGGGGCAGAGCATATC	
SsERF1_qp_F	TGGTGCAAGAGTTTGGCTTG	檢測 SsERF-1 表現之 qRT-PCR 引子
SsERF1_qp_R	AGCCTTTGATCCACGCATTC	
SsCYC_qp_F	ACCTCACAATCCAACCTGTGTGAC	檢測 SsCYC 表現之 qRT-PCR 引子
SsCYC_qp_R	CCACAGAAACCACGCAGAATTAC	
AtUBQ10_F	AGAAGTTCAATGTTTCGTTTCATGTAA	檢測阿拉伯芥管家基因 AtUBQ10 表現之 qRT-PCR 引子
AtUBQ10_R	GAACGGAAACATAGTAGAACACTTATTCA	



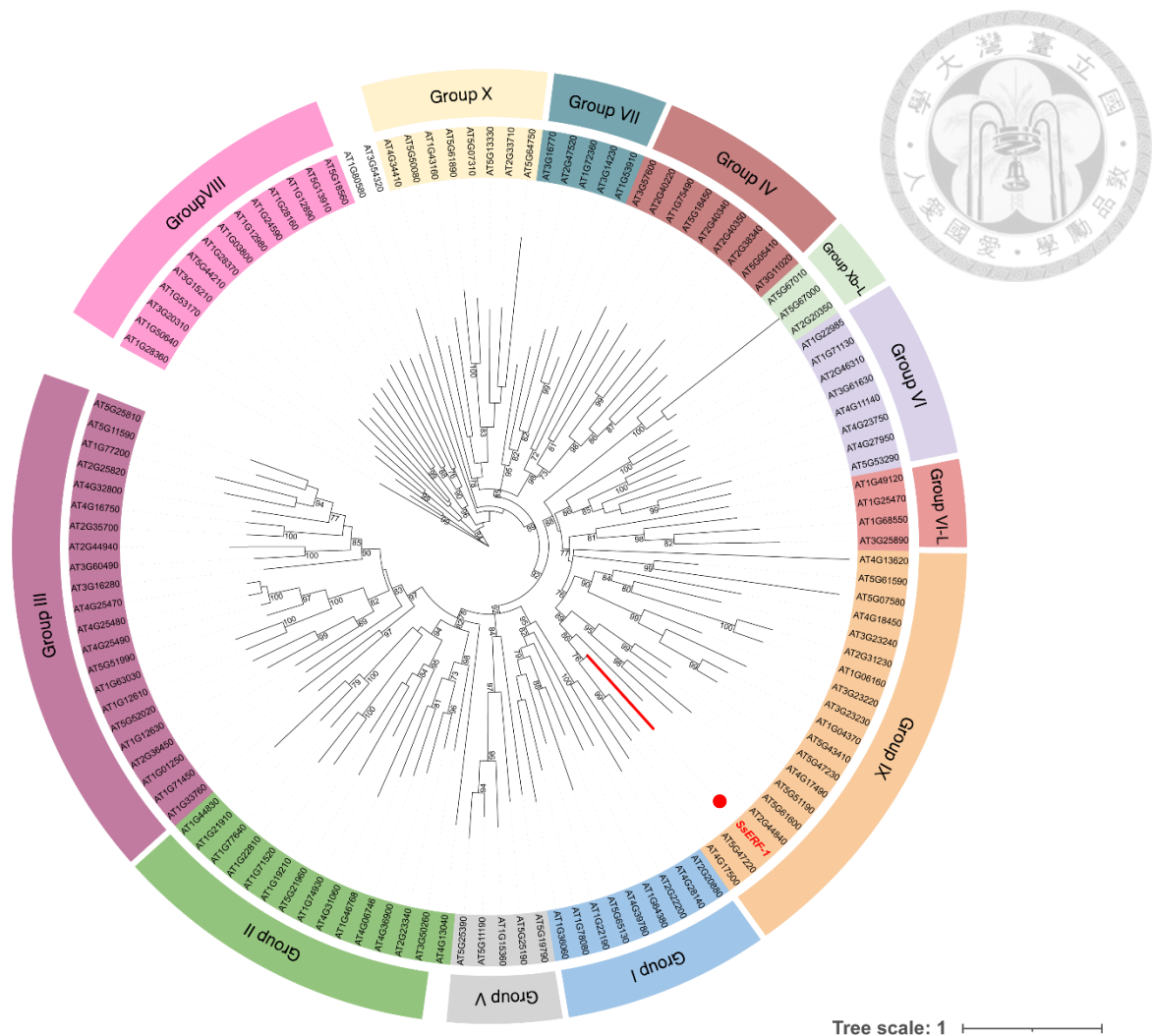
附錄表四、大岩桐第 5 期花苞進行 0.1 mM 乙烯前驅物 ACC 處理後背側花瓣細胞大小的變化量

		Gibbous	Dorsal proximal tube	Dorsal middle tube	Dorsal distal tube	Dorsal lobe
Cell area (μm^2)	ddH ₂ O	661.09 (± 14.65)	918.28 (± 24.70)	499.60 (± 8.01)	208.51 (± 3.08)	266.43 (± 4.21)
	0.1 mM ACC	651.97 (± 15.24)	843.06 (± 18.84)	333.99 (± 3.92)	140.59 (± 1.66)	193.60 (± 12.90)
Cell area reduction ratio (%)		1.38	8.19	33.15	32.57	27.34



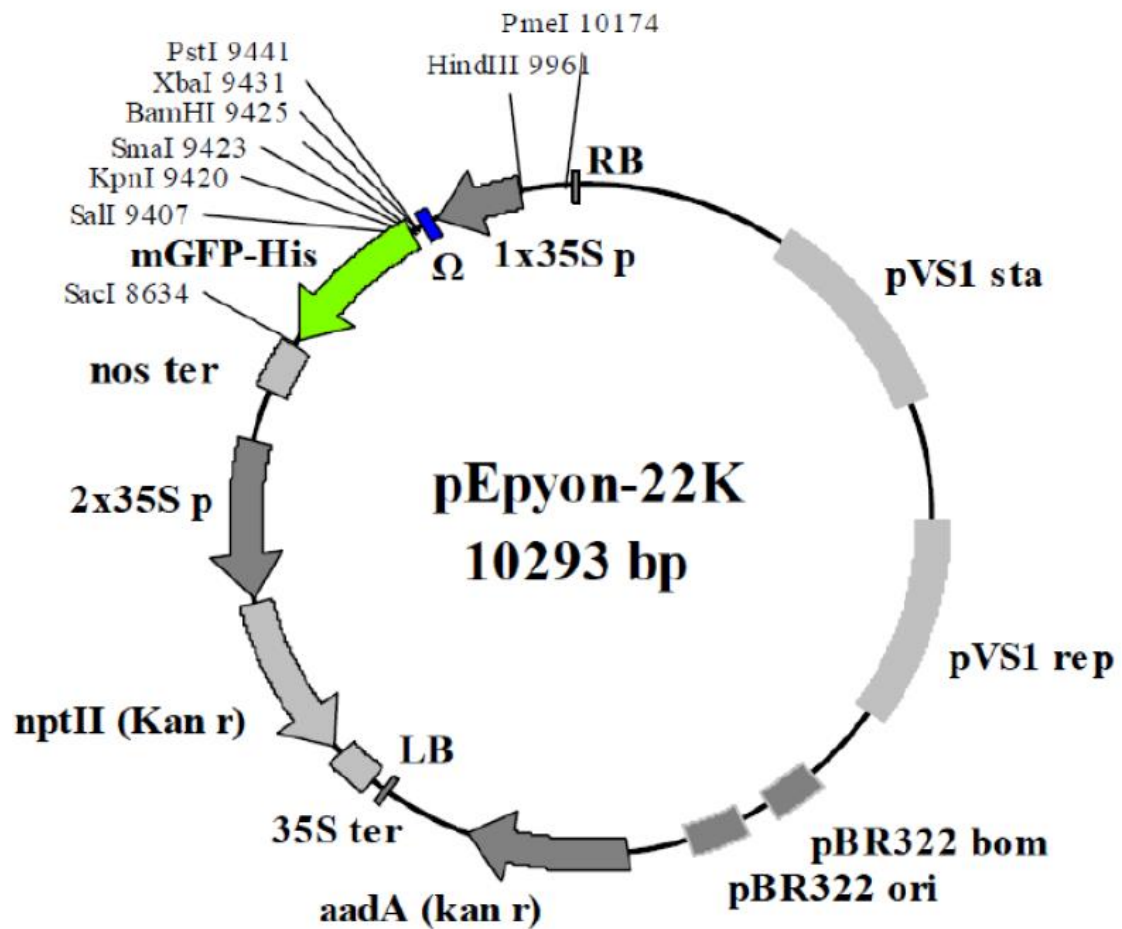
附錄表五、大岩桐第 5 期花苞進行 0.1 mM 乙烯前驅物 ACC 處理後腹側花瓣細胞大小的變化量

		Dorsal proximal tube	Dorsal middle tube	Dorsal distal tube	Dorsal lobe
Cell area (μm^2)	ddH ₂ O	778.78 (± 14.23)	297.31 (± 4.22)	180.53 (± 2.51)	277.64 (± 3.58)
	0.1 mM ACC	588.29 (± 10.03)	179.79 (± 2.33)	135.86 (± 1.72)	185.84 (± 2.33)
Cell area reduction ratio (%)		24.46	39.53	24.74	33.07



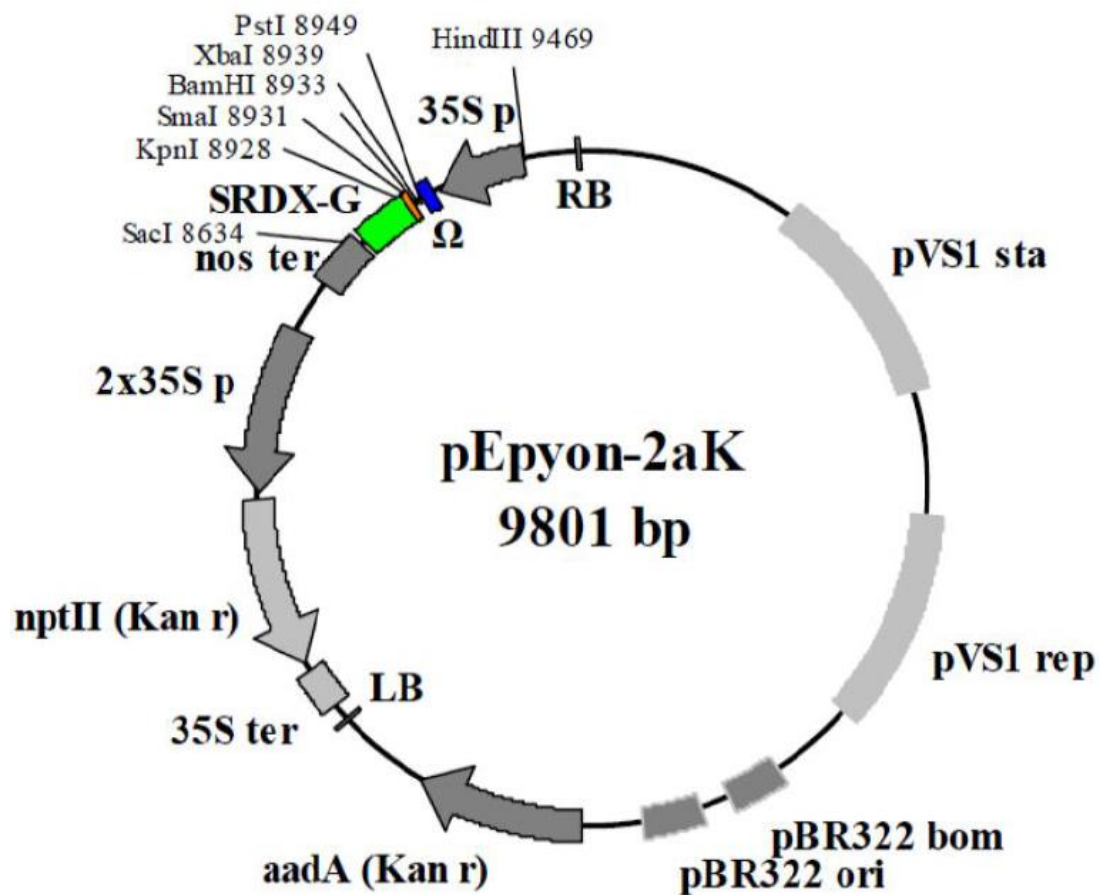
附錄圖一、以最大概似估計統計法建立之乙烯反應因子 (ERFs) 基因親緣演化樹

以阿拉伯芥的 ERF 轉錄因子家族基因與大岩桐 *SsREF-1* 所建立的基因親緣演化樹。使用 122 個阿拉伯芥的 ERF 基因與大岩桐 ‘Espirito Santo’ *SsERF-1* 基因，利用最大概似估計 (Maximum likelihood, ML) 統計法以 PhyML 3.0 建樹 (Guindon et al., 2010)，統計採樣重複 1000 次以評估分支的支持度 (Bootstrap)，並以 iTOL v6 整理呈現 (Letunic & Bork, 2007)。ERF 轉錄因子家族參照「Genome-Wide Analysis of the ERF Gene Family in Arabidopsis and Rice」分為 Group I-X 十個分支群 (Nakano et al., 2006)。演化樹上各節點之支持度數字僅呈現 Bootstrap > 70。



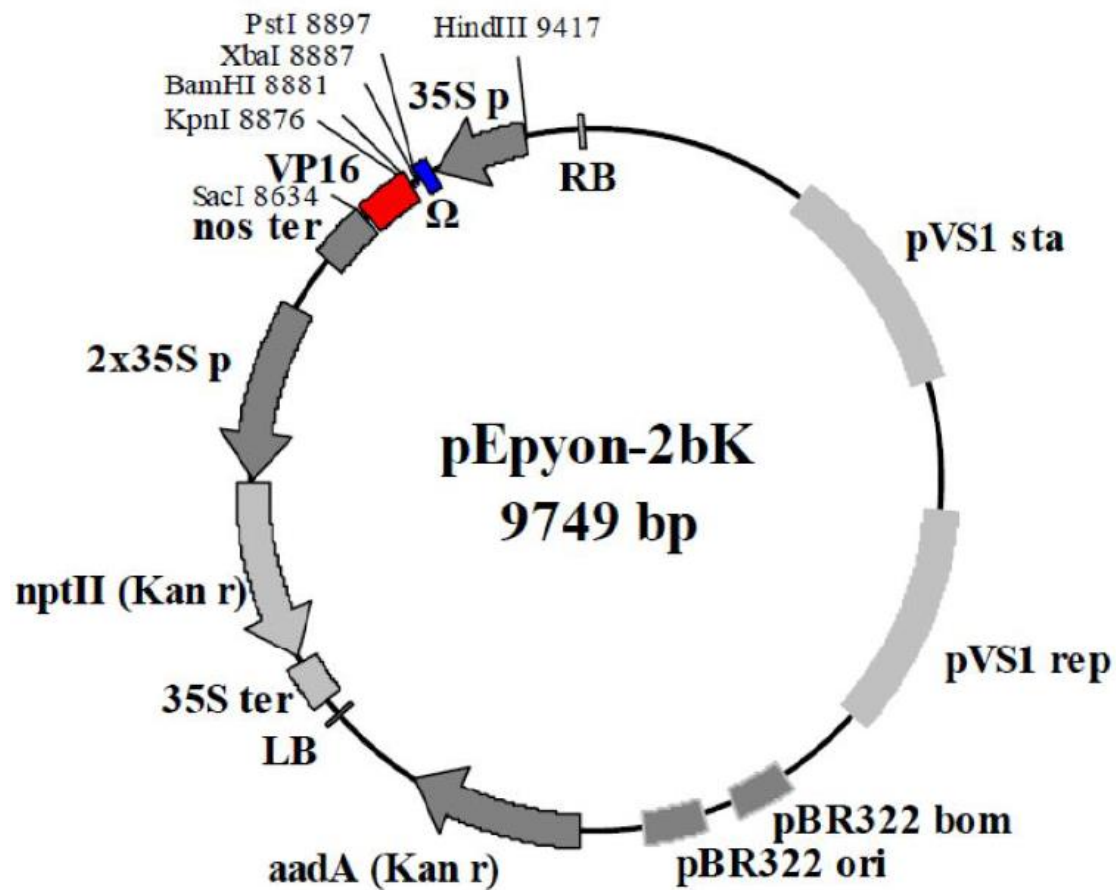
附錄圖二、pEpyon-22K 載體圖譜

本載體上帶有 35S 啟動子和 Ω ，以及可供篩選的 Kanamycin 抗性基因和 mGFP 綠螢光蛋白序列，可使構築至載體上的目標基因大量表現。本載體來自國立中興大學楊長賢老師實驗室 (許巍瀚, 2012)。



附錄圖三、pEpyon-2aK 載體圖譜

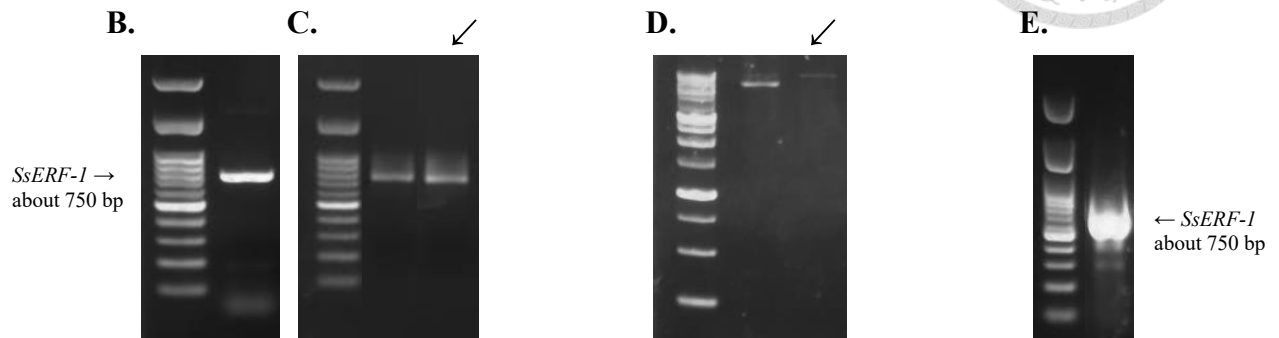
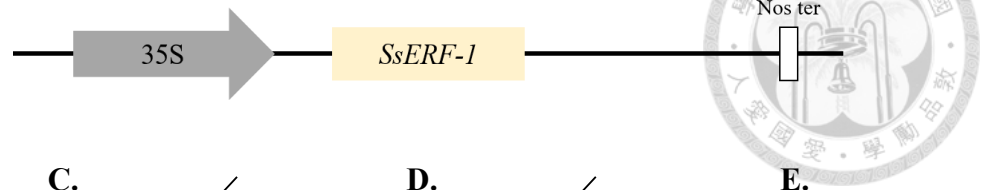
本載體上帶有 35S 啟動子、 Ω 和 SRDX 抑制子序列，以及可供篩選的 Kanamycin 抗性基因，可使構築至載體上的目標基因大量表現並抑制下游基因的表現。本載體上的 mGFP 綠螢光蛋白為經載體修飾後的不完整序列，來自國立中興大學楊長賢老師實驗室（許巍瀚, 2012）。



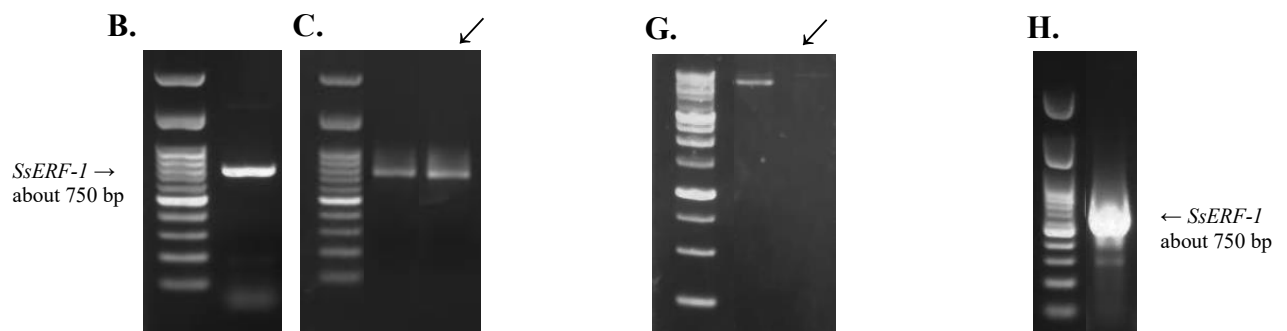
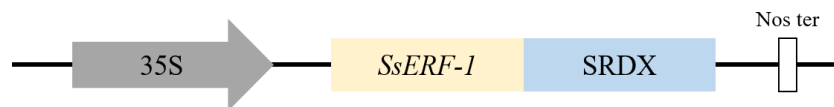
附錄圖四、pEpyon-2bK 載體圖譜

本載體上帶有 35S 啟動子、 Ω 和 VP16 活化子序列，以及可供篩選的 Kanamycin 抗性基因，可使構築至載體上的目標基因大量表現並促進下游基因的表現。本載體來自國立中興大學楊長賢老師實驗室（許巍瀚, 2012）。

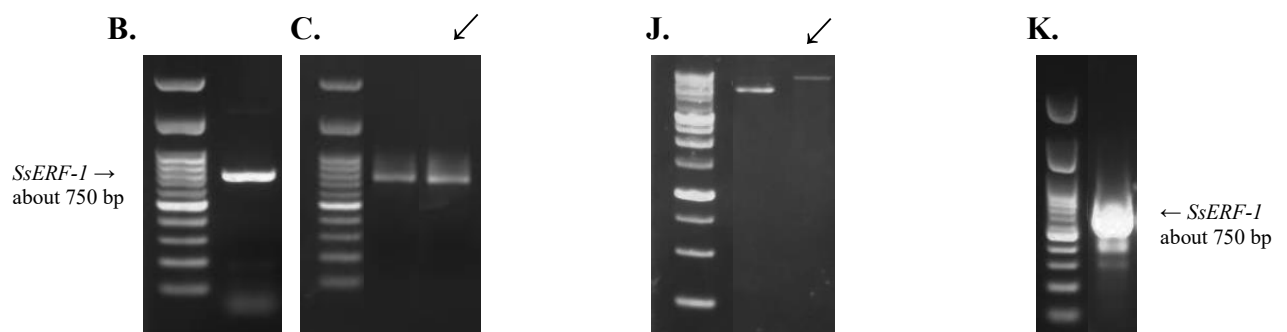
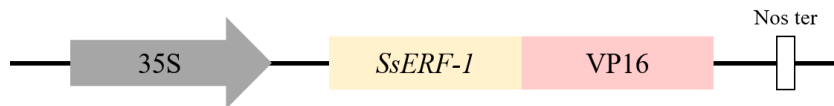
A. pEpyon-22K



F. pEpyon-2aK



I. pEpyon-2bK

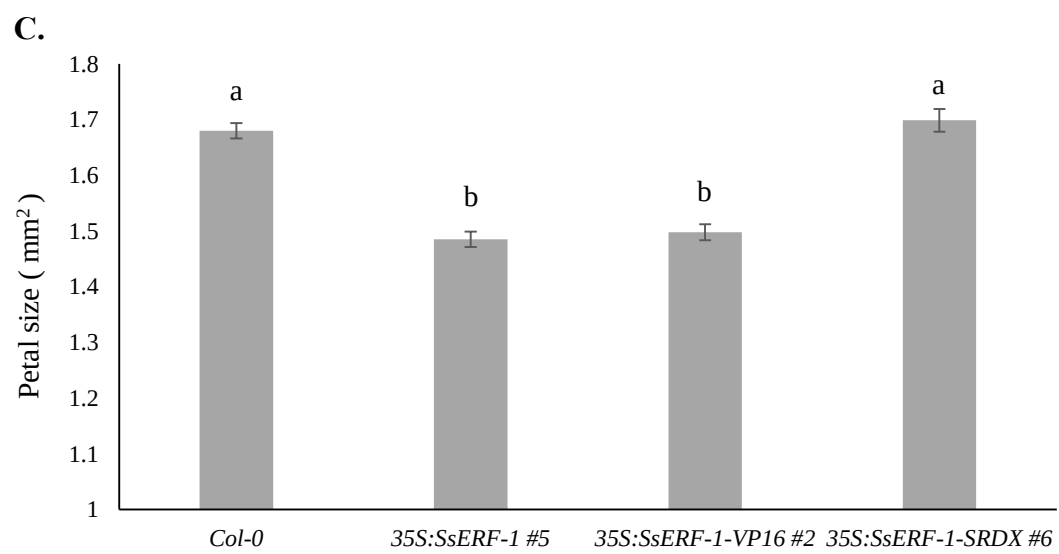
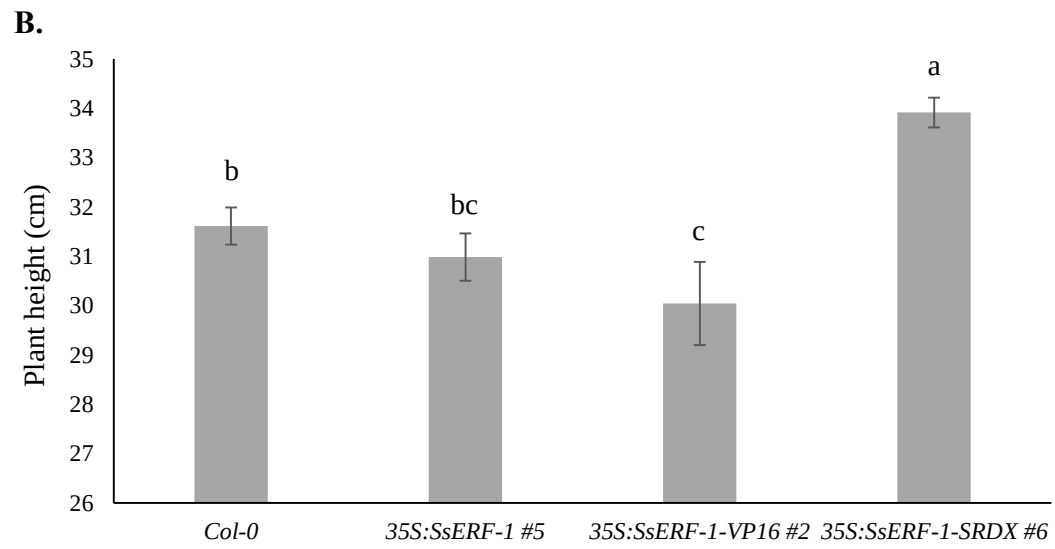
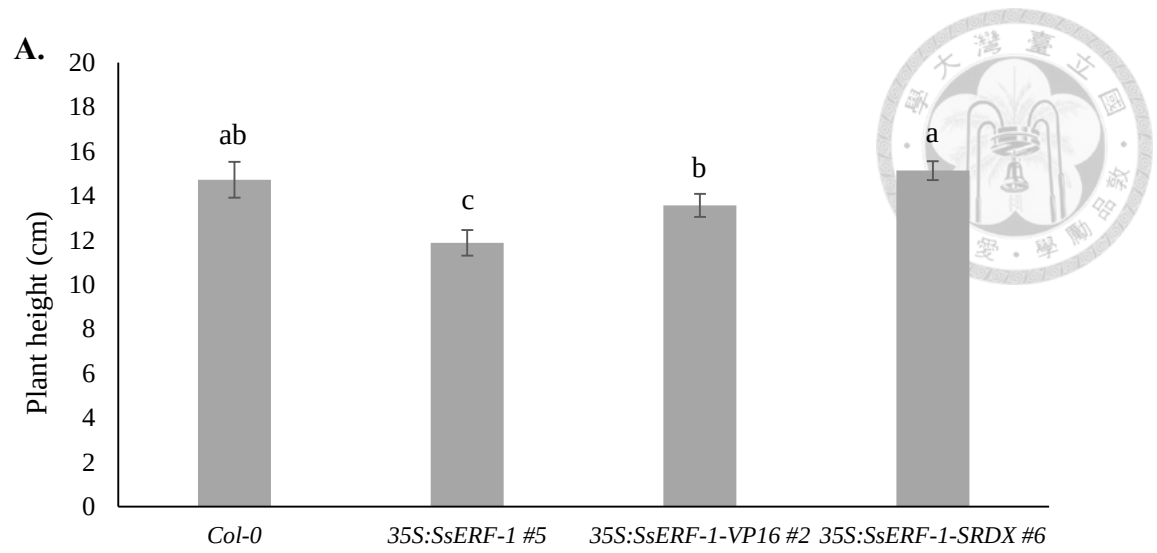


附錄圖五、*SsERF-1* 阿拉伯芥異位表達轉殖載體的構築



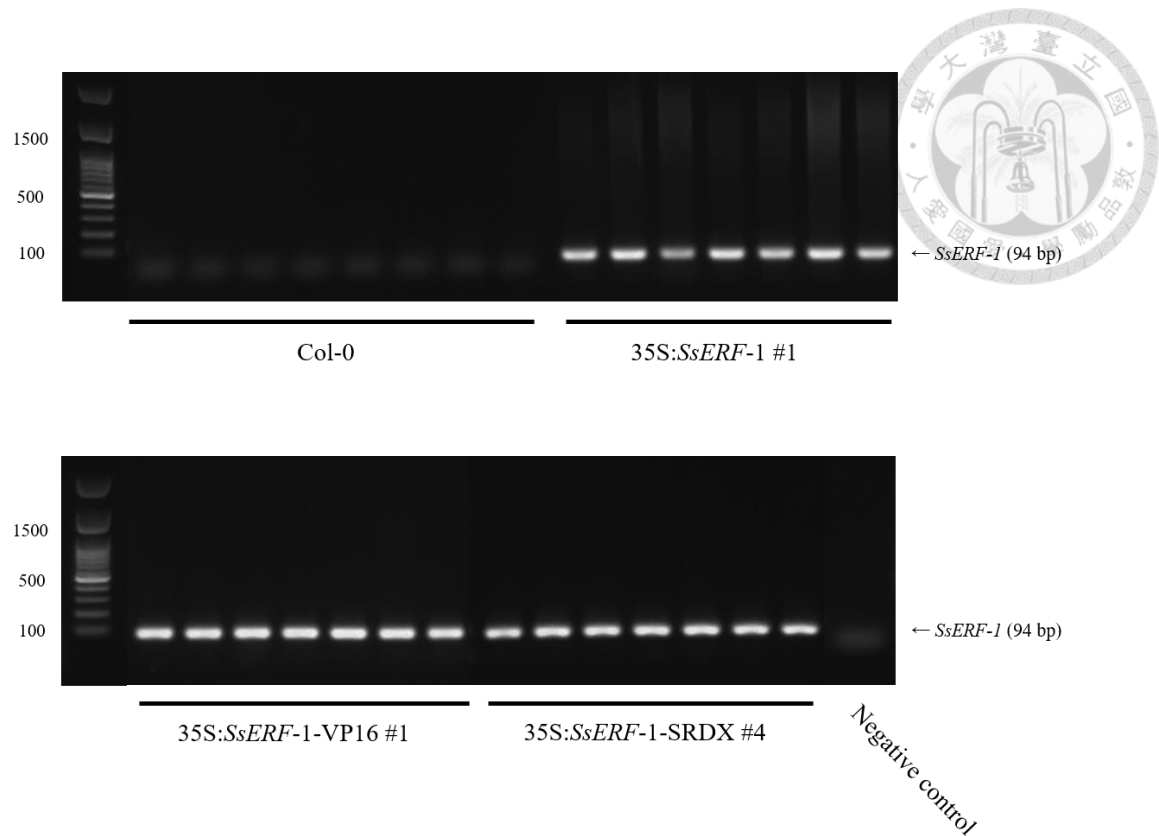
將目標基因大岩桐 *SsERF-1* 構築至 pEpyon-22K、pEpyon-2aK、pEpyon-2bK 三個異位表達轉殖載體上之過程，此部分確認載體構築成功所使用的引子對為 *SsERF1_F_r* 與 *SsERF1_R_r*，即帶有限制酶切位用以擴增 *SsERF-1* CDS 之引子對，而非位在載體上的序列（見附錄表二）。

A、將 *SsERF-1* 構築至 pEpyon-22K 載體之示意圖。**B**、自大岩桐第 5 期花苞之花瓣 cDNA 擴增帶有切位的 *SsERF-1* CDS (不含終止密碼子)。**C**、以限制酶裁切後的 *SsERF-1* (箭頭處，右) 與未裁切 (左) 之比較。**D**、以限制酶裁切 pEpyon-22K 載體 (箭頭處，右) 與未裁切 (左) 之比較。**E**、構築完成後以 Colony PCR 確認 *SsERF-1* 已構築至 pEpyon-22K 載體。**F**、將 *SsERF-1* 構築至 pEpyon-2aK 載體之示意圖。**G**、以限制酶裁切 pEpyon-2aK 載體 (箭頭處，右) 與未裁切 (左) 之比較。**H**、構築完成後以 Colony PCR 確認 *SsERF-1* 已構築至 pEpyon-2aK 載體。**I**、將 *SsERF-1* 構築至 pEpyon-2bK 載體之示意圖。**J**、以限制酶裁切 pEpyon-2bK 載體 (箭頭處，右) 與未裁切 (左) 之比較。**K**、構築完成後以 Colony PCR 確認 *SsERF-1* 已構築至 pEpyon-2bK 載體。



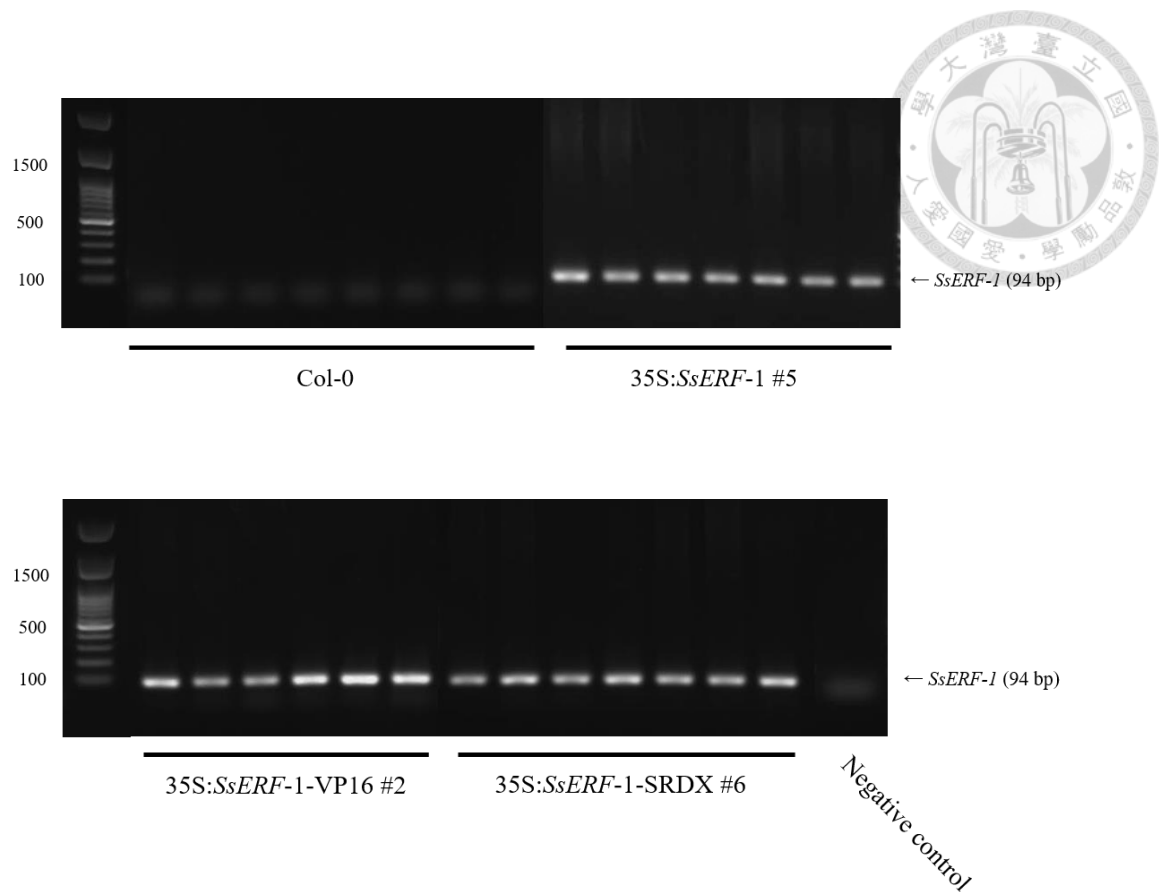
附錄圖六、長日照環境下 *SsERF-1* 阿拉伯芥轉殖株另一獨立品系之性狀

SsERF-1 阿拉伯芥異位表達轉殖株獨立品系 35S:*SsERF-1* #5、35S:*SsERF-1*-VP16 #2 及 35S:*SsERF-1*:SRDX #6 轉殖株與野生型 (WT) Col-0 在長日約 4-5 週植株高度 (A)、最終植株高度 (B) 及花瓣面積 (C)。植株數量約為 7-8 棵，花瓣數量約 100-180 片。數據以平均值 $\pm$ SE 呈現，圖上不同英文字母代表樣品間具有顯著差異 ($P < 0.05$)



附錄圖七、*SsERF-1* 阿拉伯芥異位表達轉植株的 RT-PCR 確認

透過 RT-PCR 檢驗 *SsERF-1* 阿拉伯芥異位表達之 35S:*SsERF-1* #1、35S:*SsERF-1*-VP16 #1、35S:*SsERF-1*:SRDX #4 轉植株葉片 *SsERF-1* 基因表現，以確認外來基因 *SsERF-1* 確實被轉入三種阿拉伯芥轉植株並順利表達。



附錄圖八、*SsERF-1* 阿拉伯芥異位表達轉殖株另一獨立品系的 RT-PCR 確認

透過 RT-PCR 檢驗 *SsERF-1* 阿拉伯芥異位表達之 35S:*SsERF-1* #5、35S:*SsERF-1*-VP16 #2、35S:*SsERF-1*:SRDX #6 轉殖株葉片 *SsERF-1* 基因表現，以確認外來基因 *SsERF-1* 確實被轉入三種阿拉伯芥轉殖株並順利表達。