

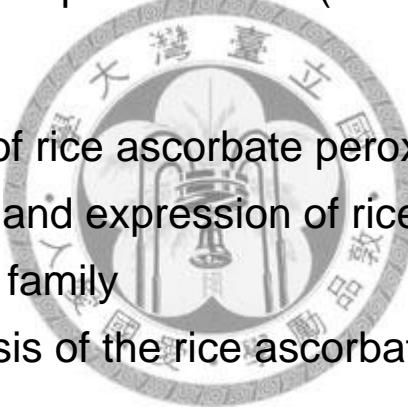
國立台灣大學生物資源暨農學院農業化學系

碩士論文

Department of Agricultural Chemistry
College of Bioresources and Agriculture
National Taiwan University
Master Thesis

水稻 Ascorbate peroxidase 基因家族功能分析

1. 水稻 Ascorbate peroxidase 基因家族之特性及表現
2. 水稻 Ascorbate peroxidase 8 (OsAPx8)的功能分析



Functional studies of rice ascorbate peroxidase gene family

1. Characterization and expression of rice ascorbate peroxidase gene family
2. Functional analysis of the rice ascorbate peroxidase 8 (OsAPx8)

高筠婷

Yun-Ting Kao

指導教授：洪傳揚 博士

Advisor : Chwan-Yang Hong, Ph.D.

中華民國 98 年 7 月

July, 2009

誌謝

碩士班的學習生涯即將告一段落，要感謝的人真的太多，不管是在課業上、實驗上還是生活上，如果沒有你們的陪伴，這段路將會窒礙難行，因為有了你們的支持，我才能什麼都不怕面對每一種挑戰。

首先要感謝的是我的指導教授洪傳揚老師，打從大三進實驗室，就感受到老師對實驗的熱情，老師對實驗的執著與專注，一直都是我努力學習的目標。常常在實驗感到迷惘的時候，老師總是拉我一把，也總是細心指導我每一項實驗技巧，讓我接受豐富且紮實訓練，真的是非常感謝老師。另外也要感謝我的口試委員們，感謝高景輝老師、鄭石通老師、張孟基老師以及葉靖輝老師，在論文寫作上給予我很多寶貴的意見，也給我很多實驗的啟發，讓我的論文更加完整也更加確實。

在實驗室的生活中，總是有實驗做不出來的挫折，很幸運的有很多人的幫忙。感謝雅貞學姐、雲洋學長在 real-time PCR 實驗上，細心的指導與協助，感謝葉老師實驗室在 subcellular localization 實驗的大力幫忙，感謝林乃君老師，總是不厭其煩的讓我了解許多實驗的真諦。感謝總有搞笑新梗的的秉宏、實驗室楷模的民宇、智利親善大使 Jorge 、脫線卻總能把事情做好的湘慧。感謝從大學一路陪伴的好朋友們，對所有事物都熱情的小元、同甘共苦的羽球強者我朋友依潔、總是冷靜穩重的覃覃、組培小天使蛻變成的正妹 OL 環萱、最會清理-80°C 冰箱的鋼彈偉競、晚餐好夥伴成康、遠在醫學院聲音仍在的鄭妹雅豬、proline 一哥阿甫。感謝實驗室貼心的學弟妹，曜全、巴栗、品儀、靖芳、如芬、婉容、鑫源、鈺雯、葉文，感謝你們為實驗室帶來的歡笑及樂趣。有你們陪伴的日子，總是笑聲連連，和你們一起努力做實驗的時光，是我人生當中很重要的旅途，未來我們也要像現在這樣互相扶持的走下去喔！

再來要感謝威宏，感謝你包容我的壞脾氣，為我加油打氣，鼓勵我面對接踵而來的挑戰，一路走來都是你陪伴在我身邊，與你分享生命中的點滴是多麼的幸福。

最後要感謝我的家人，感謝爸爸、爺爺、奶奶、妹妹，總是在背後支持著我，讓我不管什麼時候回家都有滿滿的關懷，因為有你們當我的後盾，讓我有勇氣面對所有的挑戰，也許我不常對你們說出感謝，但是我真的很愛你們。還有在天上的媽媽，我知道妳一定在天上祝福我保護我，雖然妳無法在我身邊陪著我，不過妳永遠住在我心中。

僅以本論文獻給我摯愛的家人及所有關心我的人。

目錄

口試委員會審定書	I
誌謝	II
目錄	III
附圖附表目錄	IV
圖目錄	V
表目錄	VI
中文摘要	VII
英文摘要	VIII
縮寫字對照表	X
壹、緒論	
一、非生物性逆境及氣候變遷造成全球糧食危機	1
二、植物遭遇逆境的調節及保護機制	2
三、植物面對逆境的調控機制	6
四、Ascorbate peroxidase 之研究	8
貳、研究目的	14
參、材料與方法	
一、基因表現分析	15
二、蛋白質次細胞位置分析	18
三、OsAPx8 啟動子特性分析	21
四、OsAPx8 功能性分析	24
五、補充資料	27
肆、結果	
一、水稻 APx 基因家族分子特性分析	32
二、水稻 APx8 基因功能性分析	37
伍、討論	
一、水稻 APx 基因家族分子特性分析與基因表現綜合比較	42
二、水稻 OsAPx 在兩種對重金屬耐受性不同品種之差異性比較	45
三、OsAPx 蛋白質於水稻次細胞位置分析討論	47
四、P _{APx8} /GUS 轉殖植物組織專一性及逆境誘導性之比較	47
五、水稻 OsAPx8 之功能討論	48
陸、引用文獻	50

附表附圖目錄

附表 1、阿拉伯芥中 <i>APx</i> 基因調控及功能之研究	58
附表 2、水稻及大麥中 <i>APx</i> 基因調控及功能之研究	60
附圖 1、水稻 <i>APx</i> 氨基酸保守性序列示意圖	61



圖目錄

圖 1、APx 基因家族親緣演化分析。.....	62
圖 2、水稻 <i>OsAPx1</i> 至 <i>OsAPx4</i> 基因上游 2kb 序列順式作用元件分析。.....	63
圖 3、水稻 <i>OsAPx5</i> 至 <i>OsAPx8</i> 基因上游 2kb 序列順式作用元件分析。.....	64
圖 4、APx 基因家族在水稻中之組織專一性表現分析。.....	65
圖 5、TNG67 水稻地上部在鎘、銅、鋅處理下 APx 家族之基因表現。.....	66
圖 6、TNG67 水稻根部在鎘、銅、鋅處理下 APx 家族之基因表現。.....	67
圖 7、TN1 水稻地上部在鎘、銅、鋅處理下 APx 家族之基因表現。.....	68
圖 8、TN1 水稻根部在鎘、銅、鋅處理下 APx 家族之基因表現。.....	69
圖 9、TNG67 水稻地上部在缺水、高鹽逆境及 ABA 處理下 APx 家族之基因表現。...	70
圖 10、TNG67 水稻根部在缺水、高鹽逆境及 ABA 處理下 APx 家族之基因表現。...	71
圖 11、TNG67 水稻地上部在植物荷爾蒙處理下 APx 家族之基因表現。.....	72
圖 12、TNG67 水稻根部在植物荷爾蒙處理下 APx 家族之基因表現。.....	73
圖 13、TNG67 水稻葉片刻傷處理後 APx 家族基因表現。.....	74
圖 14、水稻 <i>OsAPx1</i> 及 <i>OsAPx2</i> 次細胞位置分析。.....	75
圖 15、 P_{APx8} /GUS 轉殖水稻組織化學分析。.....	76
圖 16、 P_{APx8} /GUS 轉殖水稻之組織化學分析。.....	77
圖 17、 P_{osAPx8} /GUS 幼苗鹽份處理下 GUS 染色。.....	78
圖 18、 P_{APx8} -GUS 轉殖水稻在鹽份逆境及刻傷逆境下之組織化學分析。.....	79
圖 19、成熟葉片在短時間刻傷逆境下之 <i>OsAPx8</i> 基因表現。.....	80
圖 20、 <i>osapx8</i> 突變株之分析。.....	81
圖 21、以即時定量聚合酶方式分析水稻 8 個 APx 基因於 <i>osapx8</i> 中之表現量。..	82
圖 22、 <i>osapx8</i> 突變株在鹽份逆境處理下 APx 及 CAT 活性測試。.....	83
圖 23、 <i>osapx8</i> 突變株逆境耐受性測試。.....	84
圖 24、 <i>oe-osapx8</i> 逆境耐受性測試。 ..	85

表目錄

表 1、水稻 TNG67 及 TCN1 在重金屬處理下地上部 APx 基因表現。.....	86
表 2、TNG67 及 TCN1 在重金屬處理下根部 APx 基因表現。.....	87
表 3、兩週大 TNG67 水稻在非生物性逆境下地上部 APx 基因表現。.....	88
表 4、兩週大 TNG67 水稻在非生物性逆境下根部 APx 基因表現。.....	89
表 5、兩週大台農 67 號水稻地上部在植物荷爾蒙處以下 APx 家族之基因表現。..	90
表 6、兩週大台農 67 號水稻根部在植物荷爾蒙處下 APx 家族之基因表現。.....	91
表 7、論文使用引子列表	92



中文摘要

在植物中 Ascorbate peroxidase 是一個關鍵的抗氧化酵素，可將細胞中 H_2O_2 轉變成水。水稻中共有 8 個 *APx* 基因，其中兩個位於細胞質、兩個位於 peroxisome，四個表現在葉綠體中，然而水稻 *APx* 基因對環境外在刺激的反應仍未清楚研究。為廣泛了解 *APx* 基因表現模式，以即時定量 PCR 來分析 *APx* 基因表現，我們的結果顯示水稻多數的 *APx* 基因大量累積在幼苗地上部組織，在重金屬處理可誘導水稻根部 *APx1* 與 *APx3* 誘導 10 倍以上表現量，另外幾乎所有的 *APx* 基因都被缺水、鹽分及 ABA 處理誘導而大量在根部及地上部表現。植物荷爾蒙處理顯示除了 *APx7* 外，水楊酸顯著的在根部誘導 *APx* 基因表現。以次細胞蛋白定位分析 *OsAPx1* 及 *OsAPx2* 位置，結果顯示 *OsAPx1* 與 *OsAPx2* 皆在細胞質和細胞核中表現。我們過去的研究顯示，水稻 *APx8* 會受鹽分誘導表現，為進一步了解其在鹽分逆境下之扮演的角色，試驗中分析水稻 *APx8* 啟動子驅動 GUS 報導基因之轉殖水稻，結果顯示 GUS 在葉片、葉鞘、莖部、內外穎、種子胚乳及胚中累積，刻傷及鹽分處理也提高 GUS 在葉片中的累積。分析 *APx8* 基因嵌入突變株 *osapx8* 的活性，結果顯示地上部減少 40% 的 *APx* 活性，鹽分處理下也呈現較低的誘導性。在鹽分耐受性測試中，*osapx8* 表現對鹽分敏感之外表型，以上結果顯示 *OsAPx8* 是一個在鹽分逆境下具有保護植物功能的重要基因。

Abstract

In plants, ascorbate peroxidase is a key antioxidative enzyme which catalyze the conversion of H_2O_2 to H_2O . In rice, *APx* gene family is composed of eight genes, including two cytosolic isoforms, two putative peroxisomal isoforms, and four chloroplastic isoforms, and yet their gene expression patterns response to external stimuli remain mostly uncharacterized. To comprehensively understand the specific gene expression patterns of each individual of the *APx* gene, quantitative real-time PCR was conducted. Our results showed that most transcripts of *APx* genes are highly accumulated in the shoot tissue. The heavy metal response of *APx* indicated that more than 10 folds of *APx1* and *APx3* transcripts were induced by copper in root. Furthermore, almost all *APx* gene were significantly enhanced by dehydration, salt, and ABA either in root or shoot. Phytohormones treatments revealed that salicylic acid notably increased the expression of all *APx* genes, except *APx7*, in root. Subcellular localization analysis demonstrated that both cytosolic isoform Os*APx1* and Os*APx2* are localized at cytosol and nucleus. Our previous study showed that Os*APx8* is highly induced by salt stress in root. To further understand its roles in salt stress, *P_{APx8}::GUS* transgenic rice was generated. *P_{APx8}::GUS* transgenic plants showed that GUS accumulated in blade, sheath, stem, lemma, palea, endosperm and

embryo. Wounding and salt stress enhanced the accumulation of GUS protein in leaf. Analysis of *APx8* knockout mutant, *osapx8*, showed that APx activity decreased 40% in leaf, while lower inducibility could be observed upon salt treatment. Salt tolerant assay indicated that *osapx8* showed a salt sensitive phenotype. All these data let us conclude that *OsAPx8* is a crucial gene in protecting rice from salt stress.



縮寫字對照表

3'UTR	3' untranslated region
ABA	abscisic acid
APx	ascorbate peroxidase
AsA	ascorbic acid
BA	brassinosteroids
CAT	catalase
CIM	callus induced medium
DAB	3',3'-diaminobenzidine
DPI	diphenyleneiodonium chloride
GA	Gibberellins
GR	glutathione reductase
GSH	glutathione
GUS	β -glucuronidase
H_2O_2	hydrogen proxide
HSF	heat shock factor
JA	jasmonic acid
MV	methyl viologen
NAA	1-Naphthaleneacetic acid
NO	nitric oxide
OKA	okadaic acid
PM	pre-regeneration medium
RM	regeneration medium
ROS	reactive oxygen species
SA	salicyclic acid
SOD	superoxide dismutase



壹、緒論

一、非生物性逆境及氣候變遷造成全球糧食危機

近年來全球糧食收成的速度已無法滿足日益增加的人口，尤其在南非、中國、印度等高人口密度的地區，飢餓人口的數量急遽攀升，目前全球的飢餓人口已超過九億六千萬，尤其是在印度，約有兩億七千五百萬人生活於飢餓之中，佔總印度人口的四分之一，平均每四人就有一人處於飢餓(Meerburg et al., 2009)。造成這種現象無非是人口增長過度、糧食收成不足、糧食分配不均等因素，其中最嚴重的應該就是糧食收成不足的問題(Kelly and Buchanan-Smith, 1994; Evenson, 1999)。造成糧食收成不足的原因很多，其中氣候劇變造成的可耕地減少、氣溫上升、逆境造成的損失以及挪用糧食作物生產生質能源等都是重要的原因，經統計每年約有 80%左右的預估產量會因非生物性逆境影響而損失(Evenson, 1999)，作物生長時期遭遇到乾旱、高鹽、高溫、低溫等逆境時，不僅僅會降低作物的產量也會影響品質。在 2006 以及 2007 年時，澳洲由於嚴重乾旱，導致糧食收成分別僅為過去十年平均的 50%與 65%，乾旱及高溫等逆境對全球作物的衝擊也日益嚴重(Mittler, 2006)，另外石油與化石燃料的減產，使得肥料及農藥等價格高漲，提高農業成本進而使得糧食作物價格一併提高，近十年來糧食作物的價格已經提高二至五倍，使得貧窮國家更無法購買足夠的糧食。而生質燃料的研發也是糧食作物生產的一大競爭，為了研發製作生質燃料，各國紛紛將可耕地種植可發展生質燃料的作物，導致糧食供應失衡，像是 2007 年美國即把 5400 萬噸玉米用於生產乙醇，而歐盟也把 285 萬公頃土地改種油菜和其他作物，以生產生質燃料。如果同樣的土地用於種植食用玉米和小麥，估計可生產 6800 萬噸糧食，足夠供應 28 個非洲最不發達國家人口一年的糧食(Remington and Simms, 2002; Meerburg et al., 2009; Schneider and Garrett, 2009)。

根據研究顯示，高溫會影響穀粒的發育與充實，當夜溫超過 30°C 且溫度每提

高 1°C ，水稻的產量則會減少 10%，故溫室效應使得氣溫升高，將會嚴重影響作物產量(Peng et al., 2004)。人類過度開發使得土壤沙漠化與鹽鹹化，不僅使得可耕地減少，作物的產量及品質也受到威脅。若無法改善當前情形，在 21 世紀中期，預估一半以上的可耕地面臨乾旱及鹽分逆境而無法耕作。除高溫與鹽分外，其餘各種非生物性逆境包括重金屬、養分缺乏、氧化逆境等，對作物生長發育及產量也同時會造成影響。

二、植物遭遇逆境的調節及保護機制

植物為固生型生物，面對逆境時，植物體內生理調節與保護機制掌控植物存活與否；目前可將逆境分為非生物性逆境與生物性逆境，非生物性逆境包括乾旱、鹽分逆境、滲透壓逆境、高低溫逆境、物理傷害、重金屬逆境……等，而生物性逆境則像是細菌、病毒、昆蟲等所造成的逆境傷害。



2.1 植物常見之逆境

高溫逆境:氣候大幅度變遷，氣溫也隨溫室效應逐年上升，植物光合作用系統對光、溫度敏感性高，故容易受溫度波動而損壞。葉綠體蛋白在遭遇熱逆境(35 至 45°C)時，結構會發生改變，進而使光合作用效率降低，甚至失去光合作用功能(Vacca et al., 2004)。

乾旱逆境:水分為植物生長的限制因子，水分獲得以及時期分配往往掌控著作物的種類及作物的生長時期。缺乏水分會嚴重破壞植物體內生理恆定：乾旱逆境的訊息往往從根部開始，根部缺水使得膨壓減少，當訊息傳遞至葉部時，葉部水勢能降低使得氣孔關閉、內部二氧化碳含量降低，光合作用速率就因此降低，植物體的生長將會因此受限(Wang et al., 2003)。

鹽分逆境:植物在鹽分濃度過高的環境下，會影響種子發育及幼苗生長，並使植物的生長、分化以其體內的生理作用發生變化，鹽分逆境對植物所造成影響可分為幾個面向：滲透壓逆境(osmotic effect)、離子效應(ionic effect)、引發內生ABA合成等(Kim et al., 2005; Munns and Tester, 2008)。滲透壓逆境降低土壤溶液的水勢能，造成植物根部無法吸取水分，造成生理乾旱現象；離子效應為植物吸收過多 Na^+ 以及 Cl^- ，與其餘性質相同的離子(如 K^+)競爭，造成植物體內的離子平衡遭擾動。

養分缺乏逆境:植物生長需要足夠的養分，碳、氫、氧、氮、磷、鉀、鈣、鎂、硫、鐵、錳、硼、銅等元素為植物生長必須元素，缺乏養分將使植物無法正常生長，根據統計在亞洲約有 50% 的可耕地缺乏磷元素，故磷常為植物生長限制因子，在 2009 年 Torabi 等人利用不同濃度磷培養水稻，觀察其基因表現發現許多生理活性都因磷濃度不同而被擾動，如活性氧族清除、檸檬酸循環、訊息傳遞、植物防禦系統等都會受到缺磷影響(Torabi et al., 2009)。

重金屬逆境:植物生長對重金屬需求較微量，重金屬含量過高時，很容易吸收過量，造成植物生長受抑制；然而，非植物生長必須元素之重金屬更容易對植物生長造成威脅，抑制植物根部生長、減少根毛數目及改變內皮與皮層結構等 (Schutzendubel and Polle, 2002; Moreno et al., 2003; Ahsan et al., 2007)。類金屬也會對植物生長有不良的影響，例如砷常藉由磷的轉運蛋白進入植物體，但其毒性相當高，三價砷的高還原能力使得植物不只受到砷汙染，也伴隨著嚴重的氧化逆境(Bleeker et al., 2002; Norton et al., 2008)。

物理傷害及生物性逆境:植物在環境中受到的物理傷害逆境常與生物性逆境結合，例如在夏季颱風使植物折損，病菌由折損傷口入侵感染植物，以及昆蟲啃食等

(Francia et al., 2007; Mellway et al., 2009)。植物傷口易受細菌、病毒、真菌、昆蟲等生物侵襲，細菌病毒多由植物葉片氣孔處侵入，造成葉片黃化、壞疽等現象，或是例如水稻常見之白葉枯病常會在颱風過後感病，就是由於颱風造成水稻葉片受損，此時 *Xanthomonas* 侵入感染水稻(Liu et al., 2007; Daurelio et al., 2009)。

氧化逆境:活性氧族(reactive oxygen species, 簡稱 ROS)會攻擊細胞內大分子，如蛋白質、脂質以及 DNA 等，造成蛋白質結構受損構型異常導致喪失功能，脂質過氧化使得細胞膜破損，其上磷脂質也被破壞，細胞溶液外漏等，DNA 結構上的五碳糖骨架以及鹼基都是活性氧族攻擊的目標，骨架破壞造成 DNA 斷裂、鹼基突變甚至鹼基形成 dimer 形式，對生物體都是很大的危害(Wu and Yen, 2004)，當細胞內活性氧族累積過多時，細胞會引發程序性細胞死亡 (programmed cell death)，雖然這也是阻斷植物體受逆境的範圍，不過當過於大量細胞死亡，也將導致植物體無法存活(del Rio et al., 2002; Blokhina et al., 2003; Gao and Zhang, 2008)。



多重逆境:在自然界中逆境並不是單一存在的，通常是好幾個逆境同時發生，多重逆境並不只是單純的將幾種逆境加總在一起，逆境間的交互作用使得作物受到更大的損傷。在 2008 年 Koussevitzky 等人研究中指出，在熱及乾旱逆境下會誘導與清除活性氧族酵素、蘋果酸代謝以及與卡爾文循環 (the Calvin cycle) 相關之蛋白，*AtAPx1* 在熱及乾旱雙重逆境下被高度誘導，而 *atapx1* 基因缺乏突變株在此雙重逆境下生長勢明顯低於控制組，突變株也累積較多的 H₂O₂(Koussevitzky et al., 2008)。

2.2 活性氧族及氧化逆境

植物在正常狀態下，只要有電子傳遞鏈的作用，像是呼吸作用及光合作用，若電子接收者無法即時接收電子，即會造成小量的 ROS 產生，環境逆境也會造

成 ROS 產生，進而造成氧化逆境。常見的 ROS 包括 O_2^- (超氧自由基; superoxide radical)、 H_2O_2 (過氧化氫; hydrogen peroxide)、 $\cdot OH$ (氫氣自由基; hydroxyl radical) 與 1O_2 (單線態氧; singlet oxygen)、NO (一氧化氮; nitric oxide)，ROS 具有非常強的活性，會攻擊細胞內大分子如葉綠素、蛋白質及脂質等，ROS 與膜系上脂質反應產生脂質過氧化作用 (lipid peroxidation)，造成膜系被破壞，導致細胞內物質向外滲漏甚至脫水死亡 (Blokhina et al., 2003; Wan et al., 2007)。若脂質過氧化發生在粒線體或葉綠體等膜系構成複雜的胞器，則會嚴重影響其功能，降低粒線體呼吸作用之活性 (Taylor and Millar, 2007)，導致葉綠體固定二氧化碳能力喪失，進一步導致 NADPH 無法被利用，造成 $NADP^+$ 的含量不足，使得來自光合作用系統 PSI 的電子無法將電子傳遞給 $NADP^+$ ，細胞內不穩定電子含量過多，很容易與氧分子反應形成 O_2^- (Rodriguez et al., 2007; Roldan-Arjona and Ariza, 2009)。

2.3 活性氧族在植物中的功能

ROS 在植物生長發育、感受非生物性逆境、細胞程序性死亡以及訊息傳遞上，都是植物所必須的。在種子萌芽時期，ROS 受調節而幫助鬆弛細胞壁，以利細胞延展生長，在植物發育時期，根的發育與向地性 (gravitropism) 以及細胞壁木質化 (cell wall lignifications) 等都需要 H_2O_2 當作訊息傳遞幫助進行 (Mittler, 2002; Mittler et al., 2004)。小量 ROS 在逆境下可用於訊息傳遞、調控基因表現、活化蛋白質活性，以增加植物對逆境的耐受性。在非生物性逆境中， H_2O_2 誘導抗氧化酵素活性，幫助植物抵抗氧化逆境。前人的研究中指出，玉米高溫前處理 ($45^\circ C$) 可誘導少量的 H_2O_2 ，將玉米再移至低溫逆境中，可增加其對低溫的耐受性 (Borovskii et al., 2002)。同樣對芥菜進行高溫前處理，再移至高鹽及乾旱逆境下時，芥菜對這兩種逆境的耐受性提高，少量的過氧化氫增加，可誘導抗氧化酵素活性，提高逆境下的存活率。

三、植物面對逆境的調控機制

植物為固生型生物，無法藉由移動來降低逆境的傷害，逆境常引發植物體內 ROS 大量產生，故必須精密調控 ROS 含量，以避免其損傷細胞。植物體內主要有兩個系統用以清除 ROS，非酵素性以及酵素性的防禦機制。非酵素性防禦機制利用儲存在植物體內，或是逆境誘導生合成的抗氧化物，將活性很強的 ROS 解毒成毒性較低的物質。酵素性防禦機制，則是調整植物體內的抗氧化酵素活性，清除多餘 ROS。

3.1 非酵素性防禦機制--抗氧化物 (antioxidants)

植物體內常見的抗氧化物，例如類胡蘿蔔素(caroteoids)、維生素 C(ascorbic acid)、維生素 E(tocopherol)、compatible solutes(包括 proline 脯胺酸、glycinebetaine、糖醇類的 mannitol、sorbitol.....等)、LEA protein 等。

類胡蘿蔔素在葉片中擔任保護葉綠素的角色，避免葉綠素在強光下被破壞 (Davison et al., 2002; Giuliano et al., 2008; Wang et al., 2009)。維生素 C 普遍存在植物體中，並與 ascorbate peroxidase(簡稱 APx)共同反應清除 ROS。缺乏維生素 C 的突變株 *vtc*，其維生素 C 含量只有正常阿拉伯芥的 30%，對紫外線及強光逆境較為敏感 (Blokhina et al., 2003; Pavet et al., 2005; Colville and Smirnoff, 2008)。維生素 E 為脂溶性，通常位於膜系上，可清除 ROS 以及脂質過氧化形成的游離自由基，也可在強光下保護葉綠素。轉殖菸草降低植物體中 tocopherol 含量，結果使其在強光逆境下生長遲緩 (Thunell et al., 1997; Collin et al., 2008)。

Compatible solutes 是一類具有高溶解度的小分子量穩定化合物，即使在很高濃度時，也不會對植物體造成危害，所以在植物遭逢逆境時，可藉由調整滲透壓驅使細胞吸收水分、維持細胞膨壓、清除自由基、穩定細胞膜系以及膜上的蛋白質等。脯胺酸即屬於 compatible solutes 的一種，提高脯胺酸含量進而降低滲透壓

逆境，減少鹽分逆境之損傷，降低脯胺酸降解也可幫助植物在寒冷及高鹽逆境下，具有較高的耐受性(Chen and Dickman, 2005; Verbruggen and Hermans, 2008; Wang et al., 2009)。LEA proteins 以及 heat shock proteins 在植物感受逆境時，會大量合成表現，保護受逆境影響之細胞，減少細胞損傷。LEA protein 可與水分子結合，穩定膜系與蛋白質結構並且隔離離子。在阿拉伯芥中表現大麥葉綠體 LEA-like protein (WCS19)，明顯提高阿拉伯芥對寒害的耐受性(Tunnacliffe and Wise, 2007; Lal et al., 2008)。heat shock proteins 就像是分子伴隨蛋白 (molecular chaperone)，蛋白質生合成、translocation、蛋白質修飾及分解都需其幫助。在逆境下，heat shock proteins 會大量誘導表現，穩定膜系及其上蛋白，幫助蛋白質在逆境下正常構型(Jiang et al., 2009)。

3.2 酶素性防禦機制--抗氧化酵素 (antioxidative enzymes)

植物除了利用抗氧化物抵抗氧化逆境外，抗氧化酵素也是很重要的防禦系統，常見抗氧化酵素包括 superoxide dismutase (SOD)、catalase (CAT)、ascorbate peroxidase (APx)與 glutathione reductase (GR)等。

3.2.1 Superoxide dismutase (SOD)

SOD 是植物對抗氧化逆境的第一道防線，將毒性較大的 $O_2^{..}$ 轉變為 H_2O_2 。 $O_2^{..}$ 無法通過細胞膜，會破壞膜系以及膜系上蛋白質，故 SOD 在抗氧化機制上為相當重要的抗氧化酵素(Prashanth et al., 2008)。SOD 活性與耐鹽有很高的相關性，在水稻中大量表現 Fe SOD 或是 Mn SOD，可有效提高對氧化逆境以及鹽分逆境的耐受性(Kaminaka et al., 1999; Nohzadeh Malakshah et al., 2007)。非生物性逆境如強光逆境及過量荷爾蒙處理也會誘導 SOD 活性增加(Xu et al., 2009)。在水稻中大量表現 Sod1 可提高對氧化逆境之耐受性(Prashanth et al., 2008)。

3.2.2 Catalase (CAT)

CAT 是一個包含血紅素(heme)結構的抗氧化酵素，可將 H_2O_2 反應成 H_2O 與 O_2 。CAT 在乾旱、高鹽、氧化逆境下，活性都會被誘導(Rapala-Kozik et al., 2008)。CAT 也與生物性逆境相關，當玉米感染 *Aspergillus flavus* 時，在耐受性較高之植株中，CAT 活性被高度誘導(Magbanua et al., 2007)。

3.2.3 Ascorbate peroxidase (APx)

APx 以 AsA(ascorbic acid)作為電子提供者，將 H_2O_2 還原成水分子，APx 與 CAT 都具有血紅素結構，在細胞中負責清除 H_2O_2 ，其差異在於 APx 對 H_2O_2 的親和性較高，低濃度即可感受到 H_2O_2 存在，故細胞內精密調節 H_2O_2 以 APx 較為重要。APx 藉由 AsA-GSH 循環來掌控 H_2O_2 含量，許多逆境都會誘導 APx 的活性改變，例如水稻在 $42^{\circ}C$ 热處理下 24 小時，APx 活性誘導提高約 1.5 倍(Vacca et al., 2004)。



3.2.4 Glutathione reductase (GR)

GR 為常見的類黃酮類酵素，氧化 NADPH 將氧化態的 GSSG 還原成還原態的 GSH。GR 與鹽分、乾旱、強光、冷害、重金屬等逆境引起的氧化逆境相關，清除細胞中的 ROS 增加植物對逆境的耐受性(Romero-Puertas et al., 2006)。玉米、水稻受鹽分逆境也會誘導 GR 活性(Tsai et al., 2005)。

四、Ascorbate peroxidase 之研究

抗氧化酵素 APx 對 H_2O_2 具有很高的親和力，所以被認為是植物細胞內清除 H_2O_2 的重要抗氧化酵素。APx 活性在多種逆境下都會被誘導表現，顯示 APx 可能在抗逆境方面有其重要功能。故研究 APx 基因功能以及逆境下的表現，將可找出關鍵基因，未來在植物抗逆境上將有很大的助益(Laloi et al., 2007; Koussevitzky

et al., 2008)。目前在植物中對 *APx* 的研究以阿拉伯芥最多，從功能分析、逆境調控以及訊息傳遞等都有。而水稻為全球最多人食用之糧食作物，耕種地區也常受到乾旱、鹽分逆境等危害，故研究水稻 *APx* 基因可在未來抗逆境研究上有所幫助。

4.1 *APx* 的基因調控及訊息傳遞

阿拉伯芥基因體組中共有 9 個 *APx* 基因，其中位於細胞質的 *AtAPx1* 對 H_2O_2 累積量的調節及訊息傳遞相當重要。在缺水及高溫雙重逆境下，缺乏 *AtAPx1* 基因之突變株體內 H_2O_2 大量累積，對逆境也較為敏感(Koussevitzky et al., 2008)。以 microarray 分析突變株與野生型阿拉伯芥基因差異，結果顯示包括 Zat6、Zat12 與 WKRY 等轉錄因子參與其中。在阿拉伯芥中大量表現 Zat12 時，可增加植物對氧化逆境的抵抗力，缺乏 Zat12 基因則對 H_2O_2 較為敏感，並使蛋白質氧化現象加劇，因此 Zat12 可能參與調節氧化逆境下 *AtAPx1* 基因表現(Davletova et al., 2005; Volkov et al., 2006)。



在逆境下，阿拉伯芥體內 H_2O_2 累積，進而促進 *APx* 基因表現之訊息傳遞中，可能有一些熱休克轉錄因子(Heat shock transcription factors，HSFs)的參與(Panchuk et al., 2002)。阿拉伯芥中大量表現 *HsfA2* 會提高 *AtAPx2* 之表現，而 *HsfA2* 基因缺失突變株內也無法偵測 *AtAPx2* 基因表現(Nishizawa et al., 2006)。結果顯示 H_2O_2 訊息傳遞途徑可能透過不同 HSFs 參與，調控下游 *APx* 基因表現，逆境下各胞器都誘導 ROS 產生，因此才需要這麼多的 HSFs 參與。目前雖在 *AtAPx1*、*AtAPx2* 等啟動子區域發現與 HSFs 結合之 cis-acting element，不過仍需更多證據證明其關係(Volkov et al., 2006)。

4.2 阿拉伯芥 *APx* 之研究

在阿拉伯芥中，*APx* 基因受到許多非生物性逆境調控(附表 1)，*AtAPx1* 在乾

旱與熱雙重逆境、強光造成的光抑制、臭氧等逆境下被高度誘導(Conklin and Last, 1995; Kubo et al., 1995; Karpinski et al., 1997; Panchuk et al., 2002; Volkov et al., 2006; Koussevitzky et al., 2008)，另外雖 *AtAPx1* 位於細胞質，*APx1* 基因缺失造成葉綠體中 H_2O_2 清除系統喪失功能，顯示葉綠體抗氧化系統也需 *AtAPx1* 之參與(Laloi et al., 2007)，*AtAPx1* 也受 methyl viologen(簡稱 MV)、ethephon 等處理誘導，在 *AtAPx1* 啟動子區域也發現 Heat-shock *cis*-element，這也再次驗證 *AtAPx1* 與高溫逆境相關(Storozhenko et al., 1998)。

AtAPx2 在高溫逆境、乾旱、強光、刻傷、離層酸(abscisic acid, 簡稱 ABA)等逆境下被高度誘導(Karpinski et al., 1997; Panchuk et al., 2002; Fryer et al., 2003; Rossel et al., 2006; Volkov et al., 2006)。在阿拉伯芥中大量表現 *AtAPx2* 使葉部累積 ABA，故對乾旱逆境耐受性較高，在 *AtAPx2* 啟動子區域也發現有 ABA 相關活性區域，*AtAPx2* 受刻傷及強光照射雙重逆境而大量誘導表現，但訊息傳遞係以非 JA-signaling pathway 傳遞，而是以 H_2O_2 作為訊息傳遞物質(Fryer et al., 2003; Rossel et al., 2006)。

AtAPx3 在低溫、強光、 H_2O_2 及 MV 處理下表現量上升(Zhang et al., 1997)。阿拉伯芥 *AtAPx3* 位於 peroxisome，缺乏 *APx3* 基因在生長發育上與野生型阿拉伯芥無異，顯示 *AtAPx3* 角色可能不重要，或其餘 *APx* 功能足以彌補(Narendra et al., 2006)。在菸草中大量表現 *AtAPx3*，可提高菸草對氧化逆境之耐受性(Escobar et al., 2003)。阿拉伯芥 *AtAPx4* 及 *tAPx* 在隨葉片老化，其基因表現被大量抑制，顯示 *AtAPx4* 及 *tAPx* 可能在衰老過程中有其重要角色。

Miller 等人在 2007 年構築 *apx1* 與 *tapx* 基因缺失突變株，發現缺少 *AtAPx1* 加重氧化逆境傷害，而缺少 *tAPx* 却可增加在高溫逆境下之耐受性，而 *apx1/tapx*

雙重缺失突變株使開花時期受延遲、累積較多花青素，以及在光逆境下蛋白質氧化現象較少，結果顯示阿拉伯芥受氧化逆境時，需要細胞質以及葉綠體間互相調控，彼此間的 *APx* 也可相互補償，形成一複雜模式調節氧化逆境(Miller et al., 2007)。Giacomelli 等人將 *tapx* 以及 *sapx* 基因缺失突變株與 *vtc2*(缺乏內生 ascorbate 突變株)進行雜交，結果顯示 *tAPx* 以及 *sAPx* 可相互補償，*tapx/vtc2* 或是 *sapx/vtc2* 植株在強光下結果差異性不大，然而以 *sapx/tapx* 植株進行試驗發現對強光較為敏感，植株體內之抗氧化物 α -tocopherol 及 glutathione 等都會在強光下提高含量，也顯示植物體內抗氧化系統不只是酵素與酵素間會相互調控，酵素與抗氧化物間也會相互調控(Giacomelli et al., 2007)。

4.3 水稻 *APx* 之研究

水稻共有 8 個 *APx* 基因，以生物資訊方式分析胺基酸序列發現，*OsAPx1* 與 *OsAPx2* 位於細胞質，只具有保守性之活性區(Active site)及血紅素結合區(Heme-binding site)；*OsAPx3* 與 *OsAPx4* 位於 peroxisome，在胺基酸之 C 端帶有 peroxisome 之訊息勝肽；*OsAPx5* 至 *OsAPx8* 皆位於葉綠體中，其中 *OsAPx5*、*OsAPx6*、*OsAPx7* 位於葉綠體基質中，在 N 端帶有葉綠體訊息勝肽；而 *OsAPx8* 位於葉綠體類囊膜上，在 C 端具有類囊膜訊息勝肽(附圖 1)。水稻 *APx* 基因序號及在染色體上位置如下表所示，參考 Teixeira 等人對水稻 *APx* 的命名並整理。

Gene	Accession number (KOME)	Locus	Length (bps)
<i>OsAPx1</i>	AK061841	Os03g0285700	753
<i>OsAPx2</i>	AK068430	Os07g0694700	756
<i>OsAPx3</i>	AK287946	Os04g0223300	876
<i>OsAPx4</i>	AK070842	Os08g0549100	876
<i>OsAPx5</i>	AK073910	Os12g6178200	963
<i>OsAPx6</i>	AK061107	Os12g0178100	930
<i>OsAPx7</i>	AK103344	Os04g0434800	1080
<i>OsAPx8</i>	AB114856	Os02g0553200	1437

2006 年 Teixeira 等人研究中，將 OsAPx3 與 GFP 融合後，以農桿菌轉進菸草 BY-2 細胞中，發現 OsAPx3 在靠近細胞核的細胞質及周圍形成球體狀表現，此與預測略有出入，作者指出 OsAPx3 表現應係以 pER (peroxisomal endoplasmatic reticulum)型式，即是以球狀體方式出現。南瓜 peroxisomal APx 與 GFP 融合蛋白也是以 pER 型式表現，故推測 OsAPx3 表現在 peroxisome 上。Teixeira 等人也將 OsAPx6 與 GFP 融合蛋白表現於 BY-2 細胞中，發現 OsAPx6 可能位於細胞周圍的 small organelles 中，進一步以粒線體專一性染劑確認，發現 OsAPx6 位於粒線體表現(Teixeira et al., 2004; Teixeira et al., 2006)。OsAPx6 預測應位於葉綠體，作者認為在訊息勝肽預測上，係以 N 端具有較多帶氫氧根之胺基酸(hydroxylated amino acid residues)來預測，但粒線體與葉綠體之訊息勝肽難以判別，再加上阿拉伯芥中 sAPx 在粒線體及葉綠體中都有表現，蕃茄、馬鈴薯及豌豆中也發現粒腺體中具有 ASH-GSH 循環之酵素活性表現，循環中酵素之一的 MDHAR (monodehydroascorbate reductase)在阿拉伯芥中也被發現會同時位於粒線體及葉綠體表現，豌豆中 GR 也有發現同一個基因轉譯之蛋白同時出現在粒線體及葉綠體中，顯示雖然預測 OsAPx6 位於葉綠體，不過其也可能同時在粒線體中表現，以達清除粒線體中 ROS 的角色(Brouwer et al., 1986; Jimenez et al., 1997; Panchuk et al., 2005; Groten et al., 2006)。

水稻 APx 研究仍在起步階段，對個別基因功能仍未研究完全，但水稻 APx 可能參與水稻抗氧化逆境及鹽分逆境(附表 2)。外加 H_2O_2 或是 NaCl 會誘導水稻根部 APx 活性升高。以 diphenyleneiodonium chloride (簡稱 DPI，NADPH oxidase inhibitor)前處理再行鹽分逆境，使水稻根部 H_2O_2 累積減少，但 APx 活性仍會被誘導，顯示水稻高鹽逆境下的 APx 活性調控是不需經由 H_2O_2 的，而是經由 ABA 所調控(Tsai et al., 2005; Hong et al., 2007)。

水稻 *OsAPx1* 與 *OsAPx2* 受到 JA、ABA、okadaic acid (簡稱 OKA, protein phosphatase inhibitor)、高溫、水稻稻熱病病原菌(*Magnaporthe grisea*)及刻傷處理誘導表現，而 *OsAPx2* 受光週期調控，正常光照下受光照誘導表現，而黑暗時則表現量降低(Agrawal et al., 2003)。*OsAPx1* 與 *OsAPx2* 也與及 pathogen response 相關。*OsAPx1* 與 *OsAPx2* 也與鹽分逆境相關，分別在阿拉伯芥中大量表現 *OsAPx1* 及 *OsAPx2*，增加阿拉伯芥對鹽分逆境的耐受性，其中又以 *OsAPx2* 效果較為顯著，顯示在鹽分逆境上，*OsAPx2* 重要性較高(Lu et al., 2007)。Teixeira 等人研究指出兩週大水稻(cv. Taim 7) 在 0.25 mM NaCl 處理 24 小時後，*OsAPx2* 表現提高 2.5 倍，*OsAPx7* 則是在處理 96 小時後有 2.7 倍的誘導量，而 *OsAPx8* 則是在處理初期表現量下降，但隨處理時間延長表現象又逐漸上升(Teixeira et al., 2006)。水稻根部 *OsAPx8* 在鹽分逆境下受誘導表現，顯示 *OsAPx8* 在水稻根部抵抗鹽分逆境可能有很重要的角色(Hong et al., 2007)。



貳、本試驗研究目的

氣候變遷與日益增加之環境逆境使得植物生長受阻，全球糧食因逆境所損失的比率高達 60%以上，故如何克服環境逆境以增加作物產量，成為重要的研究課題，許多逆境都伴隨著氧化逆境的產生，而氧化逆境對作物生長為一嚴峻之考驗，故找出關鍵抗氧化酵素，幫助植物減少氧化逆境下損傷，成為植物抗逆境之策略，Ascorbate peroxidase 具有 H_2O_2 高親和力，故被認為是細胞中清除 H_2O_2 重要關鍵酵素之一，在阿拉伯芥中對 Ascorbate peroxidase 功能及訊息傳遞上已有較為清楚之研究，但在水稻中 Ascorbate peroxidase 的研究卻很少，水稻為全球最多人賴以維生之糧食作物，若能使水稻減少逆境造成的產量損失，將可進一步解決糧食問題。



本試驗分為兩個部分，第一部分為大規模分析在重金屬、缺水、鹽分、植物荷爾蒙及刻傷逆境下 APx 基因的反應，藉此找到不同逆境下誘導倍率最高之關鍵基因。第二部分係因在我們過去的研究中指出 $APx8$ 在高鹽逆境下會受誘導表現，故以 $APx8$ 啟動子驅動 GUS 報導基因，觀察基因組織專一性及逆境誘導性，並以 $APx8$ 基因嵌入突變株及大量表現 $APx8$ 轉殖水稻，研究 $OsAPx8$ 扮演的角色藉以推測 $APx8$ 在逆境下之功能。

參、材料與方法

一、基因表現分析

1.1 水稻材料與生長條件

選取飽滿且大小均一的台農六十七號(*Oryza sativa* L. cv. Tainung 67, TNG67)與台中在來一號(*Oryza sativa* L. cv. Taichung Native 1, TN1)水稻種子，以 2% 次氯酸鈉(NaOCl)水溶液進行消毒，並以一滴 Tween20 作為介面活性劑，消毒 30 分鐘後以清水洗淨。消毒完畢後，將種子置於墊有濕潤吸水紙之培養皿中，放入 37°C 黑暗催芽 24 小時，將發芽水稻種子平鋪於鐵質網架上，置於包覆鋁箔紙之燒杯中，以木村氏水耕液(Kimura B solution)栽培。於 30°C/25°C(日/夜溫)自然光照之人工控制氣候室培養，栽培期間每隔兩天更換一次水耕液，待幼苗第三片葉完全展開後進行處理。



本試驗將重金屬、植物荷爾蒙、鹽分分別加入水耕液中混合，由水稻根部吸收。重金屬處理係以鎘(CdCl₂)、銅(CuSO₄)、鋅(ZnSO₄)處理 6 小時後收取材料；非生物性逆境係以減少鮮重、鹽分(NaCl)處理 24 小時後收取材料；植物荷爾蒙處理係以離層酸(Abscisic acid,ABA)、吉貝素(Gibberellins,GA)、Brassinosteroids(BA)、植物生長素(本試驗以 NAA 處理)、茉莉花酸(Jasmonic acid,JA)、水楊酸(Salicylic acid, SA)處理 6 小時後收取材料；刻傷處理係於水稻葉片上以刀片造成刻傷，放置 30 分鐘及 60 分鐘後收取材料。

1.2 RNA 製備

1.2.1 RNA 萃取

水稻材料放入以液態氮預冷之研鉢研磨，加入液態氮研磨至粉末狀，過程中注意不可使粉末回潮，最後以藥杓將材料放入 2 mL 微量離心管中。加入 1 mL TRIzol® Reagent (InvitrogenTM, Cat no. 15596-018)至微量離心管中，均勻混合後

置於室溫下 5 分鐘，使 TRIzol®Reagent 與樣品充分作用後，加入 0.2 mL 的 chloroform(© Merck KGaA, Cat no. 102395)，將混合液劇烈搖晃 15 秒，置於室溫 2 到 3 分鐘。將混合液在 4°C 下以 12,000g 的速度離心 15 分鐘，將有機層與水層分開，取上層水層至新的微量離心管中，並添加 0.5 mL 2-propanol(© Merck KGaA, Cat no. 100994)，置於室溫下 10 分鐘後，將混合液在 4°C 下以 12,000g 的速度離心 10 分鐘，可於管底得到一小塊白色沈澱物，移除上清液後，加入 75% 的酒精 (ethanol)，劇烈搖晃清洗沈澱物。在 4°C 下以 7,500g 的速度離心 5 分鐘，再以 95 % 的乙醇清洗沈澱物，移除上清液去除酒精後，短暫風乾沈澱物(勿讓沈澱物完全乾燥，會降低溶解度)，加入 50 μ L DEPC-H₂O (diethylpyrocarbonate H₂O, AMRESCO®)，於乾浴槽以 55-60°C 加熱 10 分鐘溶解 RNA。



1.2.2 RNA 定量

取 3 μ L 的 RNA，以 Tris-HCl 稀釋至 200 μ L，以分光光度計(eppendorf, BioPhotometer)測量，波長 260 nm 進行定量，OD₂₆₀ / OD₂₈₀ 值大於 1.8 的樣品為佳。若樣品的 RNA 濃度大於 1 μ g μ L⁻¹，則以 DEPC-H₂O 稀釋至約 1 μ g μ L⁻¹。

1.2.3 RNA 電泳

取 5 μ g RNA 至 1.5 mL 微量離心管中，加入 10 μ L glyoxal reaction mixture (10 mL 之 glyoxal reaction mixture 中含有 6 mL 60%DMSO, 2 mL 6M glyoxal, 1.2 mL 10X BTPE buffer, 0.6 mL 80% glycerol, 0.2 mL EtBr) 並混合均勻，於 55°C 下加熱 30 分鐘，加熱完之樣品放至冰上 2 分鐘，加入 RNA loading dye 後混合均勻並離心，以 BTPE 緩衝液(1 公升 10 倍 BTPE 緩衝液含有 62.8g Bis-Tris, 30.2g PIPES, 2 mL 0.5M EDTA, 1 mL DEPC，混合均勻後置於 37°C 隔夜，以高壓蒸氣滅菌釜去除 DEPC 後，置於室溫儲存)製備 0.8% 琼脂凝膠膠體，並以裝有 1 倍 BTPE 緩衝液之電泳槽進行電泳分析，確認 RNA 品質後可進行試驗(水稻地上部應有五條分

離清楚之 RNA 片段，水稻根部應有三條分離清楚之 RNA 片段)。

1.2.4 DNase 處理

為去除 RNA 樣品中之 DNA 殘留，以避免干擾定量試驗，以 TURBOTM DNase (Ambion[®], Cat no. AM2239) 進行處理，配方為 15 μ L RNA($1\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$), 1 μ L TURBO DNase, 5 μ L 10X TURBO DNase buffer, 29 μ L DEPC-H₂O，混合液置於 37°C 反應 30 分鐘，反應完成後加入 5 μ L DNase inactivation reagent，置於室溫下反應 2 分鐘，以 10000g 離心 2 分鐘後吸取 40 μ L 上清液，即為除去 DNA 之 RNA 樣品，儲存於-20°C 冰箱。

1.3 合成第一股 cDNA

本試驗以 EPICENTRE[®] Biotechnologies 之 MMLV High Performance Reverse Transcriptase (Cat no. RT80110K) 合成第一股 cDNA，首先利用高溫將引子與 RNA 黏接(8 μ L RNA ($0.25\ \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$), 1 μ L 50 μM Oligo(dT)₂₀, 1 μ L DEPC-H₂O)，混合液在 65°C 下反應 2 分鐘，取出後置於冰上至少 1 分鐘，短暫離心後加入反應試劑 (2 μ L 10X MMLV RT buffer, 2 μ L 100 mM DTT (dithiothreitol), 2 μ L 10 mM dNTP, 0.5 μ L MMLV High Performance Reverse Transcriptase, 0.5 μ L ScriptGuard RNase Inhibitor, 3 μ L DEPC-H₂O)，混合均勻後於 37°C 反應 60 分鐘，最後以高溫 85°C 終止反應，反應後產物置於冰上至少 1 分鐘後，稀釋第一股 cDNA 至 $20\ \text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ ，保存在-20°C 供後續試驗利用。

1.4 基因表現分析

1.4.1 專一性引子對的設計

以 OsAPx1 至 OsAPx8 基因的三端未轉譯區進行序列比對，再根據各基因專一性區域設計引子對，引子之 Tm 值約在 58 至 60°C，而設計出的引子放大片段約

為 100 個鹼基對，將引子序列交由生工公司(*MD Bio, Inc.*)合成。使用引子對進行測試前，以解離曲線圖形(dissociation curve)判定是否只含單一的峰形(peak)，若只含單一峰形且與不加模版的接離曲線也有很大差異，就可以此引子進行後續基因表現分析。本試驗用之引子對如附表一所示(qAPx1FW, qAPx1RV, qAPx2FW, qAPx2RV, qAPx3FW, qAPx3RV, qAPx4FW, qAPx4RV, qAPx5FW, qAPx5RV, qAPx6FW, qAPx6RV, qAPx7FW, qAPx7RV, qAPx8FW, qAPx8RV)。

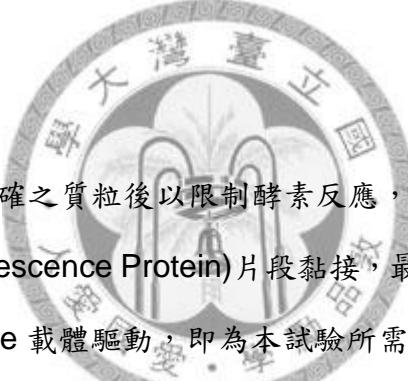
1.4.2 即時定量聚合酶連鎖反應 (Real-Time PCR)

以各處理之第一股 cDNA 當作模板，以 *APx1* 至 *APx8* 專一性引子進行反應，使用試劑為 Clontech Labotatories, Inc. 公司所生產的 SYBR® Advantage® qPCR Premix 反應組，並以 ABI 7500 及時定量 PCR 系統進行測試。PCR 反應溶液中包含 10 μ L 2X SYBR Advantage qPCR Premix, 0.8 μ L 5 μ M Forward primer, 0.8 μ L 5 μ M Reverse primer, 0.4 μ L 50X ROX Reference Dye LMP, 2 μ L Template (20 ng μ L $^{-1}$), 6 μ L H₂O，反應溶液完全離心後，確認微量離心管管蓋完全密閉，即可放入 PCR 系統中。PCR 反應過程為 50°C 2 分鐘, 95°C 10 分鐘, 95°C 15 秒鐘, 60°C 1 分鐘(此階段接收 SYBR 訊號)，重回 95°C 15 秒鐘階段並再進行 39 次循環，95°C 15 秒鐘, 60°C 1 分鐘, 95°C 15 秒鐘。反應結束後收集數據，以欲研究基因之 Ct 值減去內部控制組 *OsActin1* 基因之 Ct 值後得到 ΔCt ，取 $2^{-\Delta Ct}$ 的值表現基因不同處理間的相對表現量。本試驗利用 $2^{-\Delta Ct}$ 值進行比較而不是利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值，係因為我們在組織專一性試驗中發現各 APx 基因的 RNA abundance 差異性很大，若是只以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值進行比較，可能只能觀察基因表現差異，而無法進一步了解各基因之重要性，故本試驗採用 $2^{-\Delta Ct}$ 的值來進行比較。

二、蛋白質次細胞位置分析

2.1 輽體構築

向日本 KOME 網站索取帶有 *OsAPx* 基因之質粒，以此質粒作為模板進行 PCR 放大，Reverse primer 係去除基因尾端 stop codon，各基因所需引子如附表一所示(gAPx1FW, gAPx1RV, gAPx2FW, gAPx2RV, gAPx3FW, gAPx3RV, gAPx4FW, gAPx4RV, gAPx5FW, gAPx5RV, gAPx6FW, gAPx6RV, gAPx7FW, gAPx7RV, gAPx8FW, gAPx8RV)。PCR 產物經由 DNA 電泳分離，再經由 ©Geneaid Gel/PCR DNA fragment extraction kit 回收 DNA 片段，以 Yeastern Biotech Co. 之 yT&A Cloning Vector Kit 進行 DNA 片段與載體黏合，黏合後產物送進大腸桿菌(XL1-Blue)中，在培養基中添加 X-gal (bromo-chloro-indolyl-galactopyranoside) 進行藍白篩選，篩選培養基上之白點，並以液態培養基培養隔夜，抽取質粒並送至基龍米克斯公司(©Genomics BioSci & Tech Corp.)定序。



得到鹼基序列完全正確之質粒後以限制酵素反應，將去除 stop codon 之基因片段與 GFP(Green Fluorescence Protein) 片段黏接，最後送入帶有玉米 Ubiquitin 大量表現啟動子之 D-clone 輽體驅動，即為本試驗所需載體，命名為 pAPx-GFP (pAPx1-GFP, pAPx2-GFP, pAPx3-GFP, pAPx4-GFP, pAPx5-GFP, pAPx6-GFP, pAPx7-GFP, pAPx8-GFP)。

2.2 粒子槍(Particle bombardment)試驗

2.2.1 金粒子包裹(Coating)

取 25 μ L 金粒子溶液，依序加入下列溶液：10 μ L 質粒 DNA(約含有 5 μ g dsDNA)、25 μ L 1M CaCl_2 、10 μ L 100mM spermidine，以手指輕彈，將溶液於室溫下靜置 5 分鐘，利用簡易離心機離心 3 秒，移除上清液。加入 200 μ L 70% 的酒精，並上下清洗沈澱物後快速吸除，再以 95% 酒精進行相同步驟清洗，最後加入適量的 95% 酒精(約為 20 μ L)後，待後續實驗使用。

2.2.2 洋蔥表皮擊發前處理

挑選未冷藏的新鮮洋蔥，除去表皮及兩層外部鱗莖(完全除去帶有葉綠素部分)，以刀片切割出 5 公分見方之鱗莖，以鑷子將其內表皮完整撕下，放置於 MS 培養基之中心部分，保存於室溫下並保持黑暗。

2.2.3 粒子槍射擊

本試驗以 Bio-Rad Laboratories, Inc. 之 Biolistic®PDS-1000/He Particle Delivery system 進行擊發，擊發前需事先調整各裝置距離，rupture disk 及 macrocarrier 間的距離為 1/4 inches，macrocarrier 與 stopping screen 間的距離為 8 mm，洋蔥表皮細胞樣品與 macrocarrier launch assembly 間的距離 6 公分，調整氦氣壓力，使得壓力較所選用的 rupture disk (1100psi) 高出 200~300psi。每次擊發前皆以 70% 酒精消毒粒子槍組件 (rupture disk retaining cap、macrocarrier launch assembly、stainless steel fixed nest、spacer rings、stopping screen support、macrocarrier holder 及 macrocarrier cover lid) 與消耗性材料 (rupture disk、macrocarrier 及 stopping screen)。



利用 70% 酒精消毒擊發室。將 rupture disk 放入 retaining cap 中，並將 retaining cap 與 gas acceleration 旋緊。將 macrocarrier 裝入 macrocarrier holder 中，將以包裹 DNA 的金粒子均勻塗抹於 macrocarrier 上，待風乾後，再將 macrocarrier launch assembly 組件裝好。放入置於 MS 培養基上的洋蔥表皮，並對準中心點，關上門後，打開真空開關，待真空度達到 27 in. Hg 後，進行擊發。將真空解除，把樣品取出。更換新的 rupture disk、macrocarrier 及 stopping，並以 70% 酒精清理擊發室及各零件後，繼續下次的射擊。

2.2.4 樣品觀察

擊發後的洋蔥表皮細胞樣品，置於 27°C 黑暗培養室中 24 小時，再以 Zeiss Axio imager.m11 螢光顯微鏡觀察，觀察時將洋蔥表皮細胞從 MS 培養基中小心剝下置於載玻片上，滴上去離子水後，以蓋玻片小心蓋上(防止氣泡產生)，接著置於螢光解顯微鏡的載物台上觀察。

三、OsAPx8 啟動子特性分析

3.1 輽體構築

為更進一步研究 OsAPx8 之組織專一性及逆境誘導性，我們製備了 OsAPx8 啟動子驅動 GUS(β -glucuronidase)報導基因的轉殖水稻。以水稻基因體 DNA 為模板，以 OsAPx8 啟動子區域專一性引子(PAPx8-2KFW,PAPx8-0.8KFW,PAPx8RV)進行 PCR 反應，得到兩種長度之啟動子片段產物。PCR 產物經由 DNA 電泳分離，回收 DNA 片段後進行 TA Cloning 與載體黏合，載體轉殖進大腸桿菌後篩選並定序(同步驟 2.1)。獲得鹼基序列完全正確之質粒後，以限制酵素 Spe I 與 Sal I 反應後，與帶有玉米 Ubiquitin 第一個 intron 及 GUS 報導基因之載體 CYH10 黏接，最後再利用限制酵素 Kpn I 反應，並黏接載體與 pCambia1302，此載體命名為 P_{APx8}-0.8K/GUS 與 P_{APx8}-2K/GUS。

3.2 水稻轉殖

3.2.1 水稻癒傷組織誘導

取水稻(TNG67)開花後約 10-15 天(約為乳熟期至糊熟期)之未成熟種子，在室內晾乾後，儲藏於 4°C 冰箱備用。以去除內外穎之種子進行消毒，2% 次氯酸鈉水溶液中加上一滴 Tween20 作為介面活性劑，消毒 30 分鐘後以無菌水反覆洗淨。將 10 至 15 顆種子平鋪在誘導癒傷組織的 CIM (callus induce medium)固態培養基上，以透氣膠帶(3MTM)封邊，置於 27°C 全光照培養室培養 4-6 週。挑取胚盤衍生

出的愈傷組織，繼代培養於新的 CIM 固態培養基上，經過 2 至 3 週後，即可進行轉殖。用於轉殖的愈傷組織以直徑 2 至 5 mm 為宜，繼代培養後的愈傷組織超過一個月後不宜再用於轉殖。

3.2.2 農桿菌轉型

由於農桿菌在 28°C 以上將失去其轉殖能力，故農桿菌需以電穿孔方式進行，電穿孔專用 cuvette 預先以 70% 酒精清洗，在無菌操作台中吹乾後備用。將 1 μ L 質粒 DNA 與 40 μ L 勝任細胞(Competent cell)充分混合後，移到電穿孔用的 cuvette 中，置於冰上 10 分鐘。設定電穿孔儀程式後，進行一次電激，立刻將 cuvette 置於冰中。加入 500 μ L YEP 培養基，將菌液移到新的養菌管中，於 28°C 震盪培養 30 分鐘。取 5 μ L 菌液塗於含抗生素的 YEP 固態培養基上，培養 1 至 2 天。

3.2.3 農桿菌培養與感染

挑選培養基上之單一菌落，以 3 mL YEP 液態培養基培養 1 至 2 天，接著將農桿菌液(約為培養基之千分之一比例)放入液態 AB 培養基培養 2 天，待 OD_{600} 達 0.8 至 1 之間，即可用以感染水稻愈傷組織(callus)。將 AB 培養基在 4°C 以下以 3000g 離心 7 分鐘，將上清液移除後，加入 10 mL MS 液態培養基，並使菌體完全懸浮於培養基中，倒入培養皿中備用。挑選直徑 2 至 5 mm 表面圓潤之水稻愈傷組織，使其完全浸於菌液中，再取出培養於 2N6AS 固態培養基中，於 27°C 黑暗中共培養 2 至 3 天。將與農桿菌共培養後之愈傷組織收集於滅菌過的三角瓶中，先以無菌水清洗 3 至 5 次，再以 MS 液態培養基清洗 3 至 5 次，最後以含有 250 mgL^{-1} Cefotaxime 的液態 MS 培養基進行洗滌，每小時一次，直到液體澄清。最後一次可將三角瓶置於 shaker 上震盪清洗至第二天，當溶液仍然保持澄清即可將愈傷組織移到篩選培養基上。將愈傷組織移到含有 50 mgL^{-1} Hygromycin 及 250 mgL^{-1} Cefotaxime 的篩選培養基上，在 27°C 全光照培養室中培養。

約 3 至 6 週後可以得到轉殖成功的愈傷組織，其特徵是明顯分裂出顏色金黃的球型愈傷組織。將可能轉殖成功的愈傷組織移到 PM 固態培養基上，在培養室中培養 7-10 天。再將其由 PM 移到再生培養基(RM)上，在 27°C 全光照培養室中培養 3-5 週，即可得到轉殖水稻幼苗。完整長出地上部之水稻幼苗移至 MS 固態培養基中促進發根。在 MS 固態培養基培養三週後水稻幼苗即可出瓶，待馴化後即可移到溫室或田間種植。

3.2.4 轉殖水稻之篩選 (DNA 萃取與 PCR 反應)

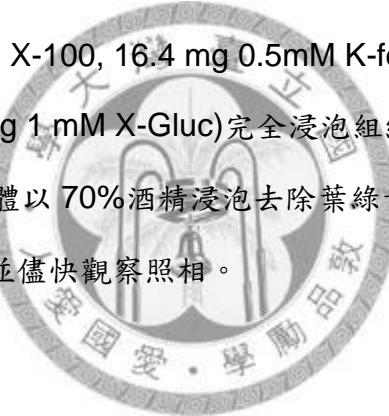
由於我們所使用的轉殖載體含有以 35S 啟動子驅動之 Hygromycin 抗性基因，故也可以此作為水稻轉殖之篩選。抽取水稻基因體 DNA 過程如下，取 0.5 g 水稻葉片以液態氮研磨粉碎後，加入 0.7 mL Urea extraction buffer (400 mL 之 urea extraction buffer 中包含 168 g 7M urea, 24 mL 5M NaCl, 20 mL 1M Tris-HCl (pH 8.0), 16 mL 0.5M EDTA (pH 8.0), 20 mL 20% sarcosine, 190 mL H₂O) 充分混合均勻但勿震盪，再加入 0.7 mL 的 phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1)，混合均勻後，置於室溫下 15 分鐘。以 8000 rpm 離心 10 分鐘後，將上清液吸出至乾淨的微量離心管，依序加入 70 μL NaOAc (3M, pH 5.2) 與 0.7 mL 異丙醇 (isopropanol，簡稱 IPA)，混合均勻後即會出現絲狀物，此絲狀物即為基因體 DNA，以微量吸取管(tip)將絲狀物勾出，並放入 1 mL 70% 酒精中清洗去除雜質，以低速離心 10 秒鐘後，除去酒精並再一次添加 95% 酒精再次清洗，離心後風乾 DNA pellet，最後以 50 μL TE buffer 回溶，儲存於 4°C 備用。

以 hygromycin 基因專一性引子(HptFW, HptRV)進行聚合酶連鎖反應(PCR)，若可以合成出 hygromycin 抗性基因，則代表其為成功的轉殖水稻。以抽取出的基因體 DNA 進行 PCR(2 μL 基因體 DNA, 4 μL 2.5 mM dNTP, 2.5 μL YEA DNA polymerase reaction buffer (Cat #YT001, Yeastern Biotech. Co., Ltd), 0.25 μL

YEA DNA polymerase, 1 μ L 5'端引子(HptFW), 1 μ L 3'端引子(HptRV), 16.25 μ L ddH₂O), PCR 反應過程為 96°C 5 分鐘, 96°C 30 秒鐘, 55°C 30 秒鐘, 72°C 1 分鐘, 重回 96°C 30 秒鐘步驟並重複 30 次, 72°C 7 分鐘, 即完成 PCR 過程, 最後再以 DNA 電泳進行片段分離, 並確認轉殖成功與否, 並以轉殖成功之水稻進行後續試驗。

3.3 組織專一性染色

以轉殖成功之水稻進行染色, 取各時期水稻組織, 如幼苗時期之根部及地下部、抽穗時期之水稻葉片、葉鞘、莖、幼花序染色, 以 GUS 染色溶液(10 mL 0.1M 磷酸鈉溶液(5.77 mL 1M Na₂HPO₄, 4.23 mL 1M Na₂HPO₄, pH 7.0), 2 mL 0.5M EDTA, 0.1 mL 100% Triton X-100, 16.4 mg 0.5mM K-ferrocyanide, 21.1 mg 0.5 mM K-ferricyanide, 44.5 mg 1 mM X-Gluc)完全浸泡組織, 置於 37°C 培養箱反應約 16 小時, 反應完全之植體以 70% 酒精浸泡去除葉綠素, 待葉綠素完全去除後, 置換新的 70% 酒精保存, 並儘快觀察照相。



3.4 逆境誘導性染色

我們利用兩種不同時期的水稻組織進行逆境誘導性試驗, 首先以轉殖水稻 T1 種子培養至兩週大, 以 200 mM NaCl 處理 24 小時後, 以 GUS 染色溶液進行 16 小時染色。另外我們取轉殖水稻抽穗時期葉片, 進行刻傷處理以及鹽分處理(200 mM NaCl)24 小時後, 同樣以 GUS 染色溶液進行 16 小時染色, 以 70% 酒精退除葉綠素後進行觀察並照相。

四、OsAPx8 功能性分析

4.1 輽體構築

為在水稻中大量表現 OsAPx8 基因, 我們以水稻幼苗地上部之第一股 cDNA

當作模板，合成 *OsAPx8* 基因片段，以 PCR(2 μL 地上部 cDNA, 4 μL 2.5 mM dNTP, 2.5 μL YEA DNA polymerase reaction buffer (Cat #YT001, Yeastern Biotech. Co., Ltd), 0.25 μL YEA DNA polymerase, 1 μL 5' 端引子(OEAPx8FW), 1 μL 3' 端引子(OEAPx8RV), 16.25 μL ddH₂O) ，PCR 反應過程為 98°C 5 分鐘, 98°C 30 秒鐘, 58°C 30 秒鐘, 72°C 2 分鐘，重回 98°C 30 秒鐘步驟並重複 30 次, 72°C 7 分鐘，即完成 PCR 過程。PCR 產物經由 DNA 電泳分離，回收 DNA 片段後進行 TA Cloning 與載體黏合，載體轉殖進大腸桿菌後篩選並定序(同步驟 2.1)。獲得鹼基序列完全正確之質粒後，以限制酵素 *Spe* I 進行反應，與帶有玉米 ubiquitin 持續大量表現啟動子之載體(D-clone)進行黏接，完成之質粒命名為 pOEAPx8。完成質粒後以同 3.2 方法進行水稻轉殖，大量表現 *OsAPx8* 轉殖水稻後續代稱為 *oe-apx8*。



4.2 基因嵌入突變株篩選

為研究 *OsAPx8* 基因缺失對水稻之影響，我們從日本 TOS17 網站搜尋到 retrotransposon 插入在 *OsAPx8* 基因位置之嵌入突變株(NF0595, 後續以 *ko-apx8* 代表)，並以此突變株進行後續試驗。為避免基因型不一所造成的試驗誤差，故進行各階段篩選，以篩選出同型合子(homozygote)。

4.2.1 Genotyping

以同 3.2.4 方法萃取基因體 DNA，再以三種引子(TosLBFW, mAPx8FW, mAPx8RV)進行 PCR，若是以 TosLBFW 與 mAPx8RV 可合成出片段，則代表有 retrotransposon 的嵌入，若以 mAPx8FW 與 mAPx8RV 合成出片段，則代表有內生的 *OsAPx8* 基因存在。以同 3.2.4 方法進行 PCR，則野生型只能合成出內生 *OsAPx8* 基因片段，異型合子(heterozygote)可合成出內生 *OsAPx8* 以及 retrotransposon 片段，同型合子則只能合成出 retrotransposon 片段。

4.2.2 半定量 RT-PCR

以同 1.2 及 1.3 方法萃取 *oe-apx8* 與 *ko-apx8* 之 RNA，並合成第一股 cDNA 後，以半定量 RT-PCR 方式，進行 *OsAPx8* 基因片段合成，以 *OsActin* 作為內控制組進行定量，並以 ddH₂O 調整各個 cDNA 量達一致後，再以 *APx8* 內生基因之引子進行半定量 RT-PCR(2 μL cDNA, 4 μL 2.5 mM dNTP, 2.5 μL YEA DNA polymerase reaction buffer (Cat #YT001, Yeastern Biotech. Co., Ltd), 0.25 μL YEA DNA polymerase, 1 μL 5' 端引子(rAPx8FW), 1 μL 3' 端引子(OEAPx8RV), 16.25 μL ddH₂O)，PCR 過程同方法 3.2.4，PCR 反應過後以 DNA 電泳分離片段並拍照。

4.2.3 酶素活性測定

為了解 *oe-apx8* 及 *ko-apx8* 對水稻 APx 活性影響，故檢測水稻地上部、根部之 APx 酶素活性。分別收集兩週大水稻的地上部及根部，以三株為一個重複，收取三重複之樣品，並保存在-80°C 冰箱。由於需以蛋白質活性作為基準，故先檢測樣品蛋白質含量。將水稻樣品以少許液態氮研磨至粉狀，加入 4 mL 50 mM sodium phosphate buffer(pH 6.80)研磨萃取，收集至微量離心管中，在 4°C 下以 17600g 離心 20 分鐘，收集上清液待用。將 20 μL 蛋白質萃取液加入 5 mL 蛋白質染劑中，混合均勻後靜置 10 分鐘，以 OD₅₉₅ 測定吸光值，並以公式計算蛋白質含量(蛋白質含量(mg)=A₅₉₅ ÷ 0.01(K, μg⁻¹ cm⁻¹) × 200(稀釋倍數) ÷ 1000)。以相同的蛋白質萃取液進行 APx 酶素活性測定，測定的混合液如下：0.1 mL 蛋白質萃取液, 1 mL 150 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0), 1 mL 1.5 mM ascorbate, 0.4 mL 0.75 mM EDTA, 0.5 mL 6 mM H₂O₂，混合均勻後以 OD₂₉₀ 測量 1 分鐘，觀察 OD 質差異進行計算，APx 酶素活性 (unit mg⁻¹)=ΔA₂₉₀ ÷ 2.8 (K, mM⁻¹ cm⁻¹) × 3 (mL) ÷ 1 (min) × 40 (稀釋倍數) ÷ 蛋白質含量 (mg)。除了在正常培養狀態下的 APx 活性，我們也檢測了以鹽分處理過後的 APx 活性，觀察在處理後各種植株對鹽分逆境之

反應。

4.3 鹽分耐受性測定

為了解 *oe-apx8* 及 *ko-apx8* 之鹽分耐受性，我們分別以切離葉及整株植物進行試驗。以整株兩週大 *ko-apx8* 水稻處理 200 mM NaCl(以水耕液調配)約 24 小時後，放回不含鹽分之水耕液中回復約 5 天，觀察並拍照記錄外表型差異。除了整株植物的外表型之外，我們也以兩週大水稻第二葉的切離葉片進行試驗，將第二葉切離葉片切下後，分別置於含 0, 100, 200 mM NaCl 水耕液之液面，並放置於持續光照下處理 48 小時，觀察葉片黃化現象並拍照。由於仍未取得 *oe-apx8* 的種子，故以切離葉片進行試驗，取生長期相近之切離葉片，與同 *ko-apx8* 方法分別置於含 0, 100, 200 mM NaCl 水耕液之液面，觀察並拍照記錄。



五、補充資料

5.1 DNA 電泳

以聚合酶連鎖反應後或適當限制酵素酶切後之 DNA 片段，加入 1/5 倍體積的 6X Loading Dye (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol)。以 TAE 緩衝液製成瓊脂膠體 (含 Ethidium Bromide)，放入含 TAE 緩衝液汁電泳槽以 100 伏特電壓進行電泳分離 DNA 片段，並以商業用指標劑標示片段大小。將電泳膠體置於 UV 燈下，即可觀察 DNA 片段及確認其大小。

製備 1 公升 50 倍的 TAE 緩衝液，需添加 242 g Tris base (2mole 2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol), 57.1 mL 冰醋酸 (1 mole glacial acetic acid), 100 mL 0.5 M Na₂EDTA (pH8.0) 並補滿水至 1 公升，調整 pH 值至 8.0。

5.2 DNA 片段回收 (Gel elution)

在 UV 燈下觀察到正確之 DNA 片段，以刀片切下含有目標 DNA 的膠體，將此膠體放入乾淨之 1.5 mL 微量離心管中，利用© Geneaid Biotech Ltd. Gel/PCR DNA fragment extraction kit 自膠體中回收 DNA。加入 500 μ L DF buffer，置於 55 至 60 °C 乾浴槽加熱至膠體完全溶解，期間每 3 分鐘將離心管上下搖晃。將 DF column 裝置到收集管上，並將完全溶解且回溫的樣品移到 DF column 中，利用高轉速 12000g 離心 30 秒，去除收集液後將 DF column 放回收集管上。加入 600 μ L Wash buffer，利用高轉速 12000 g 離心 30 秒後，去除收集液後，再高速離心 3 分鐘。將收集管換成 1.5 mL 微量離心管，並加入適量(約 15 至 40 μ L)的水或 TE Buffer 後靜置 2 分鐘，以 12000g 離心 2 分鐘後，所得到的液體即為含 DNA 片段的溶液，保存於 4°C 備用



5.3 勝任細胞製備 (大腸桿菌、農桿菌)

以 LB 固態培養基培養大腸桿菌(XL1-Blue)，挑選單一菌株至 3 mL LB 液態培養基(含 tetracycline 抗生素)中於 37°C 培養隔夜，將 2.5 mL 菌液倒至 500 mL LB 液態培養基中大量培養，使 OD₆₀₀ 約為 0.5 至 1。將菌液放置於冰上約 15 分鐘後，將菌液分裝至數個 50 mL 離心管，在 4°C 下以 5000g 離心 7 分鐘，將上清培養液去除後，每個 50 mL 離心管中添加 35 mL 10% glycerol 重新懸浮 pellet，反覆離心並依序以 20 mL, 10mL 反覆清洗 pellet，最後將 pellet 收集至一管，以同體積之 10% glycerol 重新懸浮，並於乾淨微量離心管中分裝 40 μ L 勝任細胞，儲存於-80°C 備用。

農桿菌電穿孔勝任細胞製備，以 YEP 固態培養基培養農桿菌(EHA105)，挑選單一菌株至 3 mL YEP 液態培養基中於 28°C 培養 1 至 2 天，以同大腸桿菌方法製備電穿孔勝任細胞。

5.4 質粒 DNA 之純化

使用© Geneaid Biotech Ltd. High Speed Plasmid mini kit，取單一菌落培養於含適當抗生素的 3 mL LB 液態培養液中，於 37°C 培養箱震盪培養 12~16 小時。吸取 1.5 mL 菌液至微量離心管中，以 13000g 離心一分鐘後，去除上清液。加入 200 μ L PD1 Buffer，使用震盪器劇烈搖晃或以微量吸取管上下吸取使菌體與 PD1 充分混合。加入 200 μ L PD2 Buffer，上下輕輕混合約十次後，靜置於室溫 2 分鐘。加入 300 μ L PD3 Buffer，上下輕輕混合至出現白色沈澱，以 13000g 離心兩分鐘。將 PD column 放置到 2 mL 收集管中，並將上個步驟的上清液加到 PD column 中。並以 13000g 離心 30 秒後，去除收集管中的廢液。加入 400 μ L W1 Buffer，以 13000g 離心 30 秒後，去除收集管中的廢液。加入 600 μ L Wash Buffer，以 13000g 離心 30 秒後，將收集管中的廢液倒掉。接著以 13000g 離心 2 分鐘。將收集管換成 1.5 mL 微量離心管，並加入適量(約 15 至 40 μ L)的水或 TE Buffer 後靜置 2 分鐘，以 13000g 離心 2 分鐘後，所得到的液體即為含質粒 DNA 的溶液，保存於 4°C 備用。



5.5 TA 輽體黏接與限制酵素黏接反應

以經過聚合酶連鎖反應及 DNA 片段回收後之 DNA 片段，以 Yeastern Biotech Co. 之 yT&A Cloning Vector Kit 進行 TA 輽體黏接，配方為 3.5 μ L DNA 片段, 1 μ L 10X buffer A, 1 μ L 10X buffer B, 0.5 μ L T vector, 1 μ L ligase, 3 μ L ddH₂O，總體積 10 μ L 的反應溶液置於室溫下隔夜，即可進行轉型作用並藍白篩選。限制酵素黏接反應係以 Yeastern Biotech Co. 之 YB rapid ligation kit (cat no. YC011)，以限制酵素反應後之片段，經由 DNA 片段回收後，配方為 1 μ L vector 片段(需經過去磷酸化，避免 self-ligation), 10 μ L insertion 片段, 2 μ L 10X buffer A, 2 μ L 10X buffer B, 1 μ L ligase, 4 μ L ddH₂O，總體積為 20 μ L 之反應溶液置於室溫下隔夜，即可進行轉型作用，並以含抗生素之培養基篩選。

5.6 培養基成分

5.6.1 細菌培養基 (LB, YEP)

LB medium (1L): 10g Bactotryptone, 10g Yeast Extract, 5g NaCl, 15g Bactoagar
(固態培養基才需添加)

YEP medium (1L): 10g Bactopeptone, 10g Yeast Extract, 5g NaCl, 15g
Bactoagar (固態培養基才需添加)

5.6.2 水稻基因轉殖用培養基

AB medium (1L): 50 mL 20X buffer A, 50 mL 20X buffer B, 5g glucose

20X buffer A (1L): 60g K₂HPO₄, 20g NaH₂PO₄

20X buffer B (1L): 20g NH₄Cl, 6g MgSO₄•7H₂O, 3g KCl, 0.2g CaCl₂, 0.05g
FeSO₄•7H₂O

Callus induction medium (CIM) (1L): 3.98 g N6 salts, 1 mL 1000X N6 vitamins,
30 g sucrose, 1 g casamino acids, 2 mg 2,4-D, 2.8 g proline, 3 g phytagel (adjust
to pH5.7)

CIM-CH medium (1L): CIM, 250 mg cefotaxime, 50 mg hygromycin

1000X N6 vitamins (100 mL): 50 mg nicotinic acid, 100 mg thiamine-HCl, 50 mg
pyridoxine-HCl, 10 g myo-inositol

2N6-AS medium (1L): 3.98 g N6 salts, 1 mL 1000X N6 vitamins, 30 g sucrose, 1
g casamino acids, 2 mg 2,4-D, 10 g glucose, 3 g phytagel (adjust to pH5.2), 200
μM acetosyringone (add after autoclaved)

Pre-regeneration medium (PM) (1L): 3.98 g N6 salts, 1 mL 1000X N6 vitamins,
30 g sucrose, 0.5 g casein, 2.8 g proline, 90 g sorbitol, 1 mL 1 g L⁻¹ NAA, 1 mL
0.5 g L⁻¹ BA, 3 g phytagel (adjust to pH5.7)

Regeneration medium (RM) (1L): 3.98 g N6 salts, 1 mL 1000X N6 vitamins, 30 g

sucrose, 1 g casaminio acids, 0.5 g NAA, 5 mg kinetin, 4 g phytigel (adjust to pH5.7)

MS medium (root induction medium) (1L): MS salts, 1 mL 1000X MS vitamins, 30 g sucrose, 3 g phytigel (固態培養基才需添加) (adjust to pH5.7)

1000X MS vitamins (250 mL): 25000 mg myo-inositol, 600 mg glycine, 25 mg thiamine-HCl, 125 mg pyridoxine-HCl, 125 mg nicotinic acid

5.7 Kimura B 水耕液成分

500X solution A (1L): 24.1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 9.25 g KNO_3 , 67.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 12.4 g KH_2PO_4

500X solution B (1L): 7.5 g Fe-citrate, 43.1 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 41.66 mL 12N HCl

10000X solution C (1L): 1.55 g H_3BO_3 , 0.34 g $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.58 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.13 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.08 g H_2MoO_4

水耕液配製時，每公升水耕液添加 1 mL solution A, 1 mL solution B, 0.1 mL solution C，並調整 pH 值至 pH4.7。

肆、結果

一、水稻 *APx* 基因家族分子特性分析

1.1 *APx* 基因親緣關係樹

利用 NCBI 網站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 搜尋已知 *APx* 氨基酸序列，其中包括水稻 8 個 *APx* 基因、阿拉伯芥 9 個 *APx* 基因、大麥(*HvAPx1*、*HvAPx2*)、玉米(*ZmAPx1*、*ZmAPx2*、*ZmAPx3*、*ZmAPx8*)、菸草(*NtAPx1*)及大豆(*GmAPx1*、*GmAPx2*、*GmpAPx*)，再以 MEGA 4.0 軟體進行親緣關係演化分析 (圖 1)。從分析結果可以發現主要分成三個群組：*OsAPx1* 與 *OsAPx2* 位於 Group A，以表現於細胞質之基因为主，只有 *HvAPx1* 位於 Peroxisome。*OsAPx3* 與 *OsAPx4* 位於 Group B，這類型之基因主要位於 Peroxisome 或其膜系上。*OsAPx5*、*OsAPx6*、*OsAPx7* 以及 *OsAPx8* 皆屬於 Group C，此類型之基因位於葉綠體基質中或是類囊體膜系上。而 *AtAPx4* 與 *AtAPx6* 雖分別位於細胞質及葉綠體基質/細胞膜/細胞核中，不過在親緣關係樹上與其他 *APx* 基因距離很遠。

1.2 水稻 *APx* 基因上游啟動子序列分析

利用 PLACE 網站分析水稻 *APx* 基因轉譯起始點上游 2Kb 序列的順式作用元件(*cis-acting element*)，並由比對結果中挑選與植物荷爾蒙、光照、非生物性逆境、病原菌、組織專一性等相關元件，以圖示標明順式作用元件位置(圖 2,3)，並以紅色星號代表 TATA BOX 預測位置。*APx* 基因上游含有大量 response regulator (ARR1AT)，也含有與鈣離子相關元件，顯示 *APx* 基因可能在感應環境逆境及調節上有其功能。光照相關元件亦普遍存在於所有 *APx* 基因，尤以 *APx2*、*APx7* 及 *APx8* 具有大量與光照相關之順式作用元件。與銅相關之 CURECORECR 存在於所有 *APx* 基因上游，雖然存在數目不多，但仍顯示 *APx* 基因的表現可能與金屬相關。缺磷及硫相關順式作用元件也可在 *APx* 基因上游找到，不過數目較少。乾旱相關元件也存在於 *APx* 基因上游序列中，以 *APx4* 於 15 個位置為最多。與 ABA

相關之元件在各 *APx* 基因中至少存在三個，顯示 *APx* 基因與 ABA 具有高度相關性。在調控 GA 表現上，GAREAT(誘導表現)及 GADOWNAT(GA 抑制表現)元件，在 *APx* 基因上游序列中有出現但數目較低，而與 GA 及病原菌相關之 WRKY10S 出現次數較多，並存在於每個 *APx* 基因中。刻傷相關元件也存在 *APx* 基因上游，以 *APx5* 及 *APx7* 有最多刻傷相關元件。在 *APx1*、*APx3*、*APx5* 及 *APx8* 上游啟動子序列中含有與高鹽逆境相關元件。

1.3 水稻 *APx* 基因表現分析

1.3.1 組織專一性分析

分析兩週大 TNG67 幼苗根部、地上部、孕穗期(花序約 10 公分)葉片、葉鞘、莖、幼花序、種子之糊粉層及胚中 *APx* 基因表現(圖 4A~H)。抽取 RNA 並合成第一股 cDNA，以 *APx* 基因 3' 端未轉譯區域 (3'untranslated region，簡稱 3'UTR) 設計專一性引子，以即時定量 PCR (real-time quantitative PCR) 偵測水稻 *APx* 基因表現。在水稻 8 個 *APx* 基因中，RNA 累積量以 *APx1*、*APx2*、*APx4* 以及 *APx8* 較高。*APx* 基因家族在年輕組織有較高的表現量，在幼苗地上部都有相當高的表現，根部則較地上部低。*APx* 基因也在葉片及葉鞘中表現，*APx2*、*APx6* 及 *APx7* 在葉鞘中有最高的表現。*APx* 基因中唯一在孕穗期葉片及葉鞘表現很低的是 *APx3*，*APx3* 只在三葉齡幼苗以及幼花序中表現，顯示其在年輕組織表現量較高。

1.3.2 逆境誘導性分析

1.3.2.1 重金屬鎘、銅、鋅逆境下 TNG67 及 TN1 之 *OsAPx* 基因表現

為了解 *APx* 基因對重金屬的反應，試驗中利用重金屬敏感及不敏感的兩種水稻品種進行重金屬逆境分析，其中 TN1 屬於對逆境較為敏感之水稻品種，相對的 TNG67 為逆境下較具耐受性之水稻品種。

TNG67 水稻幼苗地上部 *APx* 受重金屬輕微誘導(圖 5A~H, 表 1)，其中以 *APx6*

之誘導倍率最高，在三種重金屬處理下皆有兩倍以上之誘導倍率，*APx1*也同樣皆有輕微誘導表現，*APx2*及*APx8*在 0.5 mM 鎬處理下有輕微誘導，*APx2*、*APx5*及*APx8*在 10 mM 鋅處理下也有 1.5 倍之誘導量。

TN1 中，除了*APx1*及*APx6*呈現誘導表現趨勢外，其餘*APx*基因表現大多受重金屬抑制(圖 7 A~H)。*APx1*在銅及鎬處理下提高約 2 倍之表現量，*APx6*在低濃度銅處理即高度誘導，而*APx4*、*APx5*、*APx7*及*APx8*表現則受到抑制。高濃度銅處理降低*APx5*、*APx7*及*APx8*之 2 倍表現。低濃度鋅處理也抑制了*APx4*、*APx5*、*APx7*及*APx8*的表現。

相較於地上部，根部*APx*基因表現明顯的受到重金屬影響。在 TNG67 根部(圖 6A~H)，*APx8*的表現顯著的受到鋅的抑制，1 mM 鋅處理使*APx8*表現量減少 80%。*APx1*、*APx2*、*APx3*、*APx6*及*APx7*的表現則受到鎬、銅、鋅的誘導，其中又以 0.25 mM 銅處理誘導*APx1*及*APx3*表現量最高。在 TN1 根部，*APx*基因大多受金屬誘導表現(圖 8A~H)，*APx1*及*APx2*在各種處理下基因誘導量皆達 2 倍以上，銅處理與鋅處理可分別誘導*APx2*及*APx3*達 5 倍以上表現量(表 1,2)。

1.3.2.2 TNG67 水稻 *OsAPx* 基因對非生物性逆境的反應

以非生物性逆境處理兩週大 TNG67 水稻，結果顯示缺水可誘導地上部*APx6*達 5 倍以上(圖 9,表 3)。鹽分誘導水稻地上部*APx*表現，*APx3*、*APx4*、*APx5*及*APx8*在 100 mM 處理下有 2 倍左右之誘導量，*APx1*、*APx2*及*APx7*在 100 mM NaCl 處理下即有 5 倍以上之誘導，在 200 mM NaCl 處理下誘導量提高至 10 倍以上，影響最大的為*APx6*，在 100 mM NaCl 下誘導量即超過 10 倍，在 200 mM NaCl 下誘導量高達 51 倍。外加ABA 也會誘導水稻地上部*APx*基因表現，*APx7*及*APx8*有約 1.5 至 2 倍誘導，*APx1*、*APx2*、*APx3*、*APx4*及*APx5*為 3 倍以上誘

導表現，*APx6* 則有 10 倍以上誘導(圖 9,表 3)。

以非生物性逆境處理水稻根部，*APx* 基因皆有誘導之趨勢(圖 10A~H)，在缺水處理下，*APx3*、*APx6* 及 *APx8* 誘導量最為明顯，*APx6* 與 *APx8* 都有 3 倍以上之誘導量。鹽分處理下所有 *APx* 基因皆受誘導表現，*APx4*、*APx6*、*APx7* 及 *APx8* 在 100 mM NaCl 處理下即有 2 倍以上之誘導量，*APx3* 在 200 mM NaCl 處理下有 9 倍左右誘導量，為水稻根部 *APx* 基因中誘導倍率最高者。外加 ABA 處理，亦誘導所有 *APx* 基因表現，其中 *APx6* 具有最高之誘導倍率，在 2 μ M ABA 處理下即有 5 倍以上之誘導(圖 10,表 4)。

1.3.2.3 TNG67 水稻幼苗中 *APx* 基因對植物荷爾蒙的反應

以兩週大 TNG67 處理植物荷爾蒙，分別為 20 μ M 及 100 μ M ABA、20 μ M 及 100 μ M GA、10 μ M 及 50 μ M BA、10 μ M 及 50 μ M NAA、10 μ M 及 50 μ M JA、200 μ M 及 2000 μ M SA 在 27°C 恒溫下處理 6 小時。

不論是地上部或是根部，*APx* 基因表現在荷爾蒙處理下皆受到誘導表現，根部誘導量較地上部稍高。在兩週大 TNG67 水稻地上部(圖 11A~H,表 5)，所有 *APx* 基因在 ABA 處理下皆會受到誘導表現，以 *APx1* 誘導倍率最高，在 100 μ M ABA 處理下誘導量達 6 倍。GA 處理對 *APx3* 及 *APx5* 無顯著影響外，其餘 *APx* 基因皆有約 2 倍左右之誘導，以 *APx1* 在 100 μ M GA 處理下誘導 3.8 倍為最高。以 50 μ M BA 處理，*APx2*、*APx4*、*APx6*、*APx7* 及 *APx8* 在皆有 2 倍以上之誘導量，以 *APx1* 的 6 倍誘導量為最高。NAA 處理可誘導 *APx1* 與 *APx6* 約 3 倍及 6 倍表現，其中以 *APx6* 在 50 μ M NAA 下誘導 6.47 倍為最高。在 JA 處理下，以 *APx1*、*APx2*、*APx4* 與 *APx6* 受誘導表現，*APx6* 在 10 μ M JA 處理下有 9.8 倍誘導表現，為 JA 處理下誘導倍率最高者。SA 處理下 *APx* 基因表現差異性很大，在 *APx8* 有輕微抑

制現象，*APx3*、*APx5* 中不受 SA 影響，*APx2* 及 *APx7* 中基因表現提高約 1.5 倍，*APx1* 與 *APx6* 則是高度誘導表現，以 2 mM SA 處理下 *APx6* 提高 7.6 倍為最高。在植物荷爾蒙處理下，*APx6* 有最明顯之表現量差異，在上述植物荷爾蒙中表現量皆提高至少 3 倍，*APx1* 也受植物荷爾蒙處理而高度誘導表現，在 ABA、GA 等荷爾蒙中受誘導倍率為最高。

水稻根部在植物荷爾蒙處理下，*APx* 基因受誘導倍率也相當高(圖 12A~H,表 6)。ABA 處理下，所有 *APx* 基因都有 2 倍以上之誘導表現，以 100 μ M ABA 誘導 *APx2* 達 8 倍表現為最高。GA 處理下，以 *APx2* 在 100 μ M 下誘導 6.7 倍為最高，*APx1*、*APx3* 及 *APx4* 中也皆有 2 倍以上誘導表現。50 μ M BA 處理下，所有 *APx* 基因都有 2 倍以上誘導，誘導倍率最高者為 *APx1*，提高 5 倍表現量。在 NAA 處理下，*APx7* 只有輕微誘導表現之外，其餘 *APx* 基因皆有約 2 倍以上之誘導表現，其中以 *APx5* 的 5.7 倍誘導為最高。在 JA 處理下，*APx1*、*APx2*、*APx3*、*APx4* 與 *APx5* 基因受到誘導表現，*APx2* 在兩種濃度之 JA 處理下都達 4.5 倍誘導量，而 *APx8* 則受到 JA 輕度抑制表現。在 SA 處理下，只有 *APx7* 受到輕微抑制表現，其餘 *APx* 基因皆為高度誘導，尤以 *APx3* 在 200 μ M SA 處理下達 21 倍誘導量為最高。整體而言 *APx1*、*APx2*、*APx3* 與 *APx4* 在植物荷爾蒙處理下都受高度誘導表現，*APx5* 在 NAA 處理下表現量提高，而 *APx8* 在 SA 處理下高度誘導表現。

1.3.2.4 刻傷處理下 TNG67 水稻中 *APx* 基因表現

以兩週大 TNG67 水稻進行刻傷處理，在葉片上以刀片劃傷，各劃傷間距為 1 至 2 mm，刻傷後置於 27°C 恒溫光照室中，在 30 分鐘及 60 分鐘後收取材料，樣品萃取 RNA 後合成第一股 cDNA 後，以即時定量 PCR 進行 *APx* 基因表現測試 (圖 13A~H)。在刻傷處理下，*APx1*、*APx3*、*APx5*、*APx7* 及 *APx8* 基因受誘導表現，*APx1*、*APx3* 與 *APx7* 在處理 30 分鐘後即有誘導，*APx5* 及 *APx8* 略受誘導表現。

1.4 水稻 APx 蛋白次細胞定位(subcellular localization)分析

為了解水稻 APx 的次細胞定位，以玉米 Ubiquitin 啟動子驅動 OsAPx-GFP 的融合蛋白，並以基因槍轟擊洋蔥表皮後觀察 GFP 螢光。載體構築策略係將去除 stop codon 的 OsAPx 基因後與 GFP 連接，目前共構築完成 6 個 OsAPx-GFP 質粒 (pAPx1-GFP、pAPx2-GFP、pAPx4-GFP、pAPx5-GFP、pAPx6-GFP、pAPx7-GFP)。以 pAPx1-GFP 與 pAPx2-GFP 進行試驗，結果顯示 Ubi-GFP 對照組皆可明顯在細胞質及細胞核中有 GFP 表現(圖 14A)，細胞核專一性 DEAD-box 蛋白作為另一對照組，結果顯示 DEAD-box 蛋白顯著的在細胞核中表現(圖 14B)。OsAPx1 及 OsAPx2 試驗結果顯示，兩者皆在細胞質與細胞核中表現(圖 14C,D)。

二、水稻 APx8 基因功能性分析

過去我們研究發現 APx8 在水稻幼苗根部會受鹽分誘導表現，因此試驗中建立 P_{APx8}/GUS 轉殖水稻及分析 APx8 基因嵌入突變株，希望能了解 APx8 在逆境下扮演的角色。



2.1 P_{APx8}/GUS 轉殖水稻之分析

為了解 APx8 的組織專一性及對逆境的反應，此試驗建立 $P_{APx8-2K}/GUS$ 及 $P_{APx8-0.8K}/GUS$ 的轉殖水稻。取兩種轉殖植物之孕穗期葉片及葉鞘進行 GUS 染色，結果顯示，兩種轉殖水稻都在葉片切口處有明顯 GUS 累積(圖 15)，葉片內亦有 GUS 累積，不過表現量並不高；葉鞘也明顯的在切口處有 GUS 表現。

收取 $P_{APx8-2K}/GUS$ 、 $P_{APx8-0.8K}/GUS$ 各組織進行染色，兩種轉殖水稻 T0 世代中 GUS 表現相似，GUS 皆累積在葉鞘、節間、莖部組織的切口位置、幼苗地上部、根部及葉耳基部，另外在孕穗期未成熟小花的內外穎也有大量 GUS 累積，但花藥中無明顯表現。兩種不同長度啟動子在水稻中表現位置的主要差別在於種子，

轉殖 $P_{APx8-2K}/GUS$ 的種子主要表現在胚及胚乳，而轉殖 $P_{APx8-0.8K}/GUS$ 的種子， GUS 主要累積在種子糊粉層及胚乳。進一步切片以觀察葉鞘 GUS 的累積，結果顯示 GUS 主要表現於葉肉及維管束組織(圖 16)。

為了解 $APx8$ 啟動子對鹽分的反應，五天大 $P_{APx8-2K}/GUS$ 水稻以 200 mM NaCl 處理 12 小時後，以真空抽氣方式將植物體內空氣抽出並進行 GUS 染色，結果顯示鹽分處理下，水稻根部及葉尖之 GUS 累積量明顯高於對照組(圖 17)。另外我們也分析了轉殖水稻對刻傷及鹽分的反應，結果顯示 GUS 累積於刻傷處，刻傷處理後置於不同濃度 NaCl 水溶液 24 小時後染色， $P_{APx8-0.8K}/GUS$ 與 $P_{APx8-2K}/GUS$ 中都可觀察到鹽分濃度愈高， GUS 累積量變多(圖 18)。

為了進一步了解刻傷對 $APx8$ 的調控，試驗中以 TNG67 葉片為材料進行刻傷處理，以分析 $APx8$ 基因表現，結果顯示刻傷處理 10、20 分鐘時，分別誘導 1.4 倍、1.1 倍的 $APx8$ 表現量，而在處理 30 分鐘後 $APx8$ 表現量受到抑制，在 60 分鐘時基因表現則被大量抑制，與未處理時相比降低約 75%(圖 19)，此結果顯示刻傷處理僅能在處理 20 分鐘內少量誘導 $APx8$ 表現。

2.2 水稻 $APx8$ 之功能性分析

2.2.1 水稻 $APx8$ 基因嵌入突變株($ko-apx8$)篩選

我們從日本 TOS17 突變庫獲得 $APx8$ 的基因嵌入突變株 NF0595，retrotransposon 插在 $APx8$ 基因的第一個外顯子(exon)上(圖 20A)，為分析同型合子(homozygote)，試驗中以 Genotyping、半定量 RT-PCR、即時定量 PCR 以及 APx 活性進行 $ko-apx8$ 篩選。

試驗中在 NF0595 插入點附近設計專一性引子，進行 Genotyping 試驗，

TOS17 上的引子則以網站建議之跳躍子左端專一性引子，與內生基因反向引子進行試驗。結果顯示野生型只能擴增出內生基因的表現，*Heterozygote* (異型合子) 則可同時擴增初內生基因以及插入基因之表現，*Homozygote* (同型合子) 則只有 primer 2+3 能擴增出 PCR 產物(圖 20B)。

為分析 *ko-apx8* 之基因表現，試驗中以水稻 *Actin* 基因作為定量對照基因，以 *APx8* 基因專一性引子進行 RT-PCR 分析。結果顯示野生型及 *ko-apx8* 異型合子中皆可偵測到 *APx8* 基因表現，但無法在 *ko-apx8* 同型合子中偵測到 *APx8* 基因表現(圖 20C)。

為更精確的了解 *ko-apx8* 中各 *APx* 基因表現，以即時定量 PCR 分析 *ko-apx8* 中各 *APx* 基因的表現。結果顯示在 *ko-apx8* 同型合子中，幾乎偵測不到 *APx8* 的表現量，其他 *APx* 基因表現則大致相似，顯示在 *ko-apx8* 同型合子中只有 *APx8* 表現完全被抑制(圖 21)。

2.2.2 鹽分逆境下突變株之表現

2.2.2.1 *ko-apx8* 中 *APx* 及 CAT 抗氧化酵素活性分析

在未處理逆境時，*ko-apx8* 異型合子與野生型 *APx* 活性相似，而同型合子降低約 40%。200 mM NaCl 處理 6 小時後，野生型 *APx* 酵素活性與未處理者相似，*ko-apx8* 異型合子則在鹽分處理下提高約 30%的 *APx* 活性，*ko-apx8* 同型合子酵素活性並未明顯增加。在植株地上部 CAT 活性測定中，未處理逆境時，野生型、*ko-apx8* 異型合子與同型合子之 CAT 活性無明顯差異，顯示 *Osapx8* 基因缺失對地上部 CAT 影響不大，在鹽分處理下，野生型與 *ko-apx8* 同型合子之 CAT 活性並未誘導，而 *ko-apx8* 異型合子 CAT 活性提高約 25%(圖 22)。

在根部 APx 活性測定中，未處理逆境時野生型與 *ko-apx8* 之 APx 活性無明顯差異，於鹽分處理下，野生型誘導大約 2 倍 APx 活性，而 *ko-apx8* 異型合子則些微降低活性，同型合子 APx 活性也降低一半以上。植株根部 CAT 活性測定中，鹽分處理前，野生型與 *ko-apx8* 活性無明顯差異；鹽分處理後，野生型 CAT 活性受高度誘導，約有 4 倍左右之誘導量，*ko-apx8* 異型合子在鹽分處理後誘導約 2 倍，而 *ko-apx8* 同型合子 CAT 活性在鹽分處理下反而受到些微抑制(圖 22)。

2.2.2.2 *ko-apx8* 具有鹽分敏感的外表型

過去我們的研究指出 APx8 在水稻根部受鹽分逆境誘導表現，故本試驗以 *ko-apx8* 進行鹽分處理，以評估 APx8 缺失對鹽分的反應。結果顯示當兩週大水稻以 200 mM NaCl 處理 48 小時後，再移至不含 NaCl 環境回復處理一週後，*ko-apx8* 呈現葉片捲曲下垂、第二葉葉片枯黃萎縮、葉尖枯黃等現象，*ko-apx8* 異型合子在鹽分處理下也呈現葉尖枯黃與葉片捲曲之現象，不過以程度而論，對鹽分逆境耐受度為野生型 > 異型合子 > 同型合子(圖 23B,C,D,E)。取兩週大水稻幼苗第二葉進行高鹽處理，48 小時後野生型葉片葉尖開始黃化，*ko-apx8* 異型合子也呈現葉尖黃化及產生壞疽，*ko-apx8* 同型合子葉尖黃化程度與異型合子相同但壞疽範圍較大(圖 23A)。

2.2.2.3 *oe-apx8* 提高鹽分逆境耐受性

以玉米 ubiquitin 大量表現啟動子驅動 OsAPx8，並以農桿菌進行轉殖。以半定量 RT-PCR 檢測 OsAPx8 表現(圖 24A)，發現在 OE-1 與 OE-2(oe-apx8-1,2) 中，OsAPx8 表現量提高。以切離葉片進行 100 mM、200 mM NaCl 處理 48 小時。在 TNG67 野生型水稻中，100 mM NaCl 處理下有輕微黃化現象，在 200 mM NaCl 處理下黃化現象加劇，並且葉片出現壞疽。在 OE-2 中，我們可以發現鹽分處理並沒有對葉片造成明顯傷害，也觀察不到黃化現象(圖 24B)。在 OE-1 與 OE-3 的試

驗中，由於轉殖水稻葉片狀態及時期較無法精確控制，故葉片狀態不佳，導致在未處理鹽分逆境時即嚴重黃化，未來應取得T1代種子後，再進一步行耐受性測試。



伍、討論

一、水稻 APx 基因家族分子特性分析與基因表現綜合比較

在親緣關係樹中，OsAPx 基因位於不同群組中，OsAPx1 與 OsAPx2 屬於位在細胞質之 Group A (圖 1)，其中 OsAPx1 與大麥 *HvAPx1* 有最相近的胺基酸序列，但是 *HvAPx1* 在 peroxisome 膜系上表現。在 2001 年 Shi 的文章中指出，*HvAPx1* 受熱、高鹽及 ABA 誘導表現，但其誘導與 H_2O_2 效應無關，以 35S 持續大量表現啟動子在阿拉伯芥中表現 *HvAPx1*，可提高阿拉伯芥對熱逆境之耐受性(Shi et al., 2001)。與 OsAPx2 關係最為相近的為 *HvAPx2*，但目前仍無其相關功能研究。Agrawal 等人的研究指出，OsAPx1 與 OsAPx2 受到多種逆境誘導表現，也指出 OsAPx2 對逆境之反應較 OsAPx1 快(Agrawal et al., 2003)，顯示 OsAPx1 與 OsAPx2 在遭遇環境逆境時，會提高其表現量，進一步幫助植物抵抗環境逆境。

在 OsAPx 基因上游啟動子序列中，帶有相當多與植物荷爾蒙相關之順式作用元件 (圖 2,3)，如與 ABA 相關之 ABRELATERD1、ABRERATCAL，與 GA 相關的元件為 GADOWNAT 及 GAREAT，也有與 JA、SA 等相關順式作用元件。在外加植物荷爾蒙處理後，OsAPx 基因也大多具誘導性 (圖 11, 12)，其中又以 ABA 誘導量為最高，與 ABA 相關之順式作用元件數量，其中以 OsAPx7 為最多，但其在外加 ABA 處理下有約 2 倍之誘導量，在 OsAPx 基因中並不是誘導量最高者，顯示順式作用元件之預測與基因表現有相關聯性，但與存在之數量似乎並不成正比，雖然基因表現量主要與啟動子相關，但由於我們只是以生物資訊方式進行統整分析，並未真實找到啟動子區域，故與基因表現有程度上之落差。

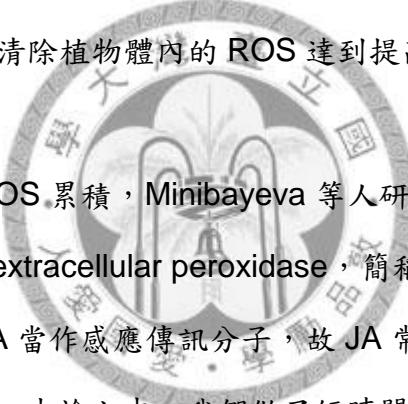
OsAPx 基因顯著受 SA 誘導表現，SA 被認為與植物病蟲害相關，當病原菌攻擊植物宿主細胞時，外來之病原菌蛋白質被植物宿主所辨認後，植物會產生警

告訊息分子 (alarm signal)，訊息傳遞至細胞各處產生一連串反應，分泌可分解細菌膜系之酵素或使其致死之毒素，而 SA 即可扮演此警告訊息分子的角色，導致植物對於侵入體產生抗病性，此類似動物細胞之免疫反應(Ganesan and Thomas, 2001; Gessler et al., 2007; Abuqamar et al., 2009)。在 *OsAPx* 基因上游啟動子序列中也有與病原菌相關之順式作用元件，過去也發現水稻稻熱病係以 H_2O_2 做為訊息傳遞，顯示生物性逆境可能也與植物體內 ROS 相關，雖然本論文並未從生物性逆境方面進行測試，不過以 *OsAPx* 基因受 SA 誘導之倍率及其他資料看來，此生物性逆境之研究將是很有潛力之研究方向。

OsAPx 基因上游啟動子序列也可找到許多與光調節相關之順式作用元件 (圖 2,3)，在光呼吸系統與光合作用系統之電子傳遞鏈上，經常伴隨著 ROS 的產生，須藉由 APx 等抗氧化酵素等方式來清除 ROS 累積，避免 ROS 造成進一步危害。當阿拉伯芥中遭遇強光逆境時，在 15 分鐘內 *AtAPx1* 及 *AtAPx2* 表現量即上升。強光逆境也會誘導產生內生 ABA，大量表現 *AtAPx2* 的植株也使植物內生 ABA 含量上升，使植株較能抵抗強光逆境。阿拉伯芥中缺乏葉綠體 APx (*tAPx*、*sAPx*) 則導致加速強光造成之葉片衰敗(Fryer et al., 2003)。綜合前人研究以及本論文於 *OsAPx* 基因上游序列分析之結果顯示，APx 酵素在受光調節系統中有其重要功能，在強光逆境下也扮演植物清除 ROS 的重要角色。

OsAPx 基因上游序列也包含 GT1GMSCAM4，係與高鹽逆境與病原菌攻擊相關之順式作用元件。在本論文測試鹽分逆境下基因表現量(圖 9,10)，發現 *OsAPx* 基因在地上部有很高倍率之誘導，*OsAPx6* 在地上部受 200 mM NaCl 處理時有大於 50 倍之誘導。Teixeira 等人研究中指出兩週大水稻 (cv. Taim 7) 之 *OsAPx2* 在 0.25 mM NaCl 處理 24 小時後基因表現提高 2.5 倍，*OsAPx7* 則是在處理 96 小時後有 2.7 倍之誘導量，而 *OsAPx8* 則是在處理初期表現量下降，但隨處理時

間延長表現象又逐漸上升；在 Lu 等人的研究中指出，OsAPx2 對鹽分耐受性之提升較高(Lu et al., 2007)。本論文中也發現在受鹽分處理下 OsAPx1 及 OsAPx2 基因表現量分別提高 13.55 倍及 12.63 倍，兩者皆為高度誘導表現。Hong 等人研究中指出水稻在 TN1 兩天大幼苗根部 APx 活性受鹽分處理而誘導，其中以 OsAPx8 在高鹽處理下表現量提高 3 倍為最高，顯示 OsAPx8 在水稻根部抵抗高鹽逆境可能扮演重要的角色；本論文中兩週大 TNG67 水稻根部在鹽分處理下，OsAPx4、OsAPx6、OsAPx7 及 OsAPx8 都有 2 倍以上之誘導倍率，可能是由於水稻品種及時期上的不同，使得基因表現量有些許差異，不過 OsAPx 基因在非生物性逆境下的誘導可為我們提供一些資訊，即是可能在非生物性逆境下，常會引發內生的 ABA 大量產生，除了 ABA 本身可藉由調整滲透壓外，也可誘導如 APx 等抗氧化酵素基因表現，清除植物體內的 ROS 達到提高逆境耐受性。



刻傷下植物會產生 ROS 累積，Minibayeva 等人研究中指出刻傷會誘導小麥根部細胞外過氧化氫酶 (extracellular peroxidase，簡稱 ECPOX) 活性上升，植物受刻傷時，也常利用 JA 當作感應傳訊分子，故 JA 常被認為與刻傷相關 (Minibayeva et al., 2009)。本論文中，我們做了短時間的刻傷處理，發現只有 OsAPx1、OsAPx3、OsAPx7、OsAPx8 有受到誘導(圖 13)，而在 JA 處理下，地上部 OsAPx1 及 OsAPx6 分別有 3 倍及 7.5 倍之誘導，在根部以 OsAPx1、OsAPx2、OsAPx3 及 OsAPx4 有 2 倍左右之誘導，同時受到刻傷及 JA 處理誘導表現的為 OsAPx1，顯示 OsAPx1 在刻傷下的基因誘導可能與 JA 之誘導相關，而其他的 OsAPx3 以及 OsAPx7 可能以與 JA 無關之訊息傳遞途徑較相關。

整體而言 APx 基因受各種逆境誘導提高表現量，而不同逆境下，各基因誘導倍率也有些許不同，顯示植物在不同逆境下，可能由不同 APx 基因負責調控，來維持細胞內的 ROS 恒定。往後將可以誘導倍率較高的基因來進行後續試驗。下面

誘導倍率最高的 APx 基因列出。

重金屬逆境

Heavy metal	Cd	Cu	Zn
Shoot	TNG67	APx6	APx6
	TCN1	APx1	APx6 (suppress)
Root	TNG67	APx1	APx1, APx3
	TCN1	APx6	APx3, APx7
			APx2

非生物性逆境

Abiotic stress	Dehydration	Salt	Wounding
Shoot	APx6	APx6	APx3
Root	APx8	APx3	

植物荷爾蒙

Hormone	ABA	GA	BA	NAA	JA	SA
Shoot	APx1	APx1	APx1	APx6	APx6	APx1, APx6
Root	APx2	APx2	APx1	APx5	APx2	APx3

二、水稻 OsAPx 在兩種對重金屬耐受性不同品種(TNG67、TN1)之差異性比較

不同水稻品種面對重金屬逆境時具有不同之耐受性，TNG67 為較具耐受性，而 TN1 則是較為敏感性之品種。本論文中也觀察 TNG67 與 TN1 在三種重金屬鎘、銅、鋅處理下 OsAPx 基因表現，地上部普遍誘導倍率較根部低，在 TNG67 地上

部只有 *OsAPx1* 及 *OsAPx6* 有約 2 倍之誘導量(圖 5)，而在 TN1 中也同樣只有 *OsAPx1* 與 *OsAPx6* 較有誘導量(圖 7)，其餘 *OsAPx4*、*OsAPx5*、*OsAPx7* 及 *OsAPx8* 基因甚至會因重金屬處理而降低表現，以鋅處理最為明顯。而本論文發現 *OsAPx1* 以及 *OsAPx2* 的 RNA 表現量(RNA abundance)在兩個水稻品種中差異很大，在未處理逆境時 *OsAPx1* 在 TNG67 地上部相對表現量約為 8，但在 TN1 中相對表現量卻只不到 0.05，同樣的 *OsAPx2* 相對表現量在 TNG67 中約為 10，而在 TN1 中相對表現量約為 0.7。*OsAPx1* 與 *OsAPx2* 在細胞質中表現，顯示其可能與細胞中清除 ROS 有關，而在 TN1 植株中 *OsAPx1* 與 *OsAPx2* 表現量較低，是否顯示 TN1 之逆境敏感性係為植株體內缺乏此兩個重要基因所致。此推測可以在 TN1 中大量表現 *OsAPx1* 及 *OsAPx2* 觀察是否使 TN1 增強對逆境誘導性，或是在 TNG67 水稻中抑制 *OsAPx1* 及 *OsAPx2* 基因表現獲得印證。



兩種水稻品種地上部皆以 *OsAPx6* 受重金屬誘導量最高，在根部 *OsAPx1*、*OsAPx3*、*OsAPx6* 及 *OsAPx7* 都有很高的誘導倍率，在 TNG67 中，高濃度鋨處理使 *OsAPx1* 基因表現提高 5 倍，而高濃度銅處理下 *OsAPx3* 也有 6.4 倍之誘導表現。在 TN1 中，幾乎所有 *OsAPx* 基因皆會因重金屬處理而誘導表現。從根部至地上部基因表現來看，在 TNG67 中根部有 2 倍以上之誘導，但只有 *OsAPx6* 同時在根部及地上部同時被重金屬處理而誘導表現，其餘基因在地下部基因表現改變並不顯著，而在 TN1 品種中，雖然根部 *OsAPx* 基因誘導量普遍在 2 倍左右，但在地上部卻大部分受抑制表現，推測可能在重金屬濃度過高使 TN1 受到毒害，導致 *OsAPx* 基因表現不增反減，進一步可利用 Evans blue 等染劑觀察細胞死亡比例，或以 DAB (3',3'-diaminobenzidine) 進行 H_2O_2 染色，觀察是否在根部有過多 H_2O_2 累積所致。

三、OsAPx蛋白質於水稻次細胞位置分析討論

以生物資訊方式預測OsAPx1及OsAPx2基因次細胞位置，兩者都被預測位於細胞質（圖1），而本論文以大量表現的Ubiquitin啟動子驅動OsAPx1、OsAPx2與GFP融合蛋白，在洋蔥表皮細胞中發現OsAPx1與OsAPx2皆不只是在細胞質表現，在細胞核也有表現（圖14），為何APx表現於細胞核中，將是一個相當值得探討的問題，未來將在粒子槍轟擊後進行逆境處理，觀察次細胞位置是否改變，以進一步探討OsAPx1與OsAPx2之調控機制。通常在細胞核中表現的蛋白，主要與基因調控相關，過去對OsAPx1及OsAPx2的研究主要著重於逆境下的ROS清除，或許可進一步觀察OsAPx1及OsAPx2是否在調控其餘OsAPx基因上有其功能性。過去在阿拉伯芥的研究中也指出，若缺乏 $AtAPx1$ ，不只是會降低細胞質ROS清除功能，也會影響葉綠體等光合作用系統的ROS清除效率，顯示APx基因之間的確會有相互作用，但是否由哪個關鍵基因進行調控，則還需要更多研究來佐證。

四、 P_{APx8}/GUS 轉殖植物組織專一性及逆境誘導性之比較

在OsAPx8基因上游啟動子分析中，轉譯起始點距離最近之預測TATA BOX在約-560左右（圖3），因此我們所使用之上游啟動子序列片段長度將是0.3 Kb與1.7 Kb。兩種轉殖植物中在成熟葉片之切口處及葉鞘切口處都有GUS累積（圖17），以 $P_{APx8-2K}/GUS-a$ 不只是在切口處有大量GUS蛋白累積，在葉鞘中也有高度累積量，此結果與OsAPx8組織專一性（圖1H）表現一致。在圖16中比較 $P_{APx8-0.8K}/GUS$ 以及 $P_{APx8-2K}/GUS$ 轉殖植物之GUS累積，兩種轉殖水稻皆在水稻幼苗地上部、葉鞘切口、葉舌與葉鞘交接處、莖部切口及幼花序外穎中表現，同時較年輕之幼花序可累積較高的GUS，而2K和0.8K啟動子表現差異最大的地方為， $P_{APx8-2K}-GUS$ 在種子中在胚中表現，而 $P_{APx8-0.8K}/GUS$ 係在水稻種子糊粉層中表現，可能是5'端2K至1.2K的序列存在一個調控APx8在種子不同位置表現的cis-acting element。就real-time PCR的組織專一性結果來看，OsAPx8在種子的表現量並

不高，且我們在取種子樣本時以胚的 RNA 為主，而 0.8K 啟動子在種子中表現較低，所以可能是以 0.8K 長度啟動子較為符合 *OsAPx8* 的表現，

以鹽分及刻傷處理水稻葉片，GUS 累積在葉片切口處，但兩種長度之 P_{APx8}/GUS 轉殖植物在鹽分處理下並沒有明顯之誘導，但刻傷處理可顯著的在刻痕處發現 GUS 大量累積，若對葉片施以刻傷及鹽分雙重逆境則可發現隨著 NaCl 濃度升高，GUS 累積有增加的趨勢，其中又以 $P_{APx8-0.8k}/GUS$ 植物較為明顯，顯示可能在上游-800 位置中具有與鹽分相關之順式作用元件。

五、水稻 *OsAPx8* 之功能討論

以 Genotyping 及 RT-PCR 方式可發現在 *ko-apx8* 中缺乏 *OsAPx8* 表現 (圖 20)，在 APx 酶素活性測試中發現，缺少 *OsAPx8* 使地上部減少 40%APx 活性(圖 22A)，且在鹽分處理下減少 APx 活性誘導幅度，顯示 *OsAPx8* 缺失影響 APx 活性甚鉅。在 *ko-apx8* 中，葉片 CAT 活性並未隨著基因缺失而喪失活性 (圖 22B)，顯示此 *ko-apx8* 專一在葉片的對 APx 造成影響。在根部 CAT 活性測試中，日本晴野生型在鹽分處理後活性大幅度增加，在 *ko-apx8* 中 CAT 活性並未增加 (圖 22D)，顯示根部缺乏 *OsAPx8* 基因會同時影響 CAT 與 APx 活性，對其他抗氧化酵素如 SOD 及 GR 等活性的影響仍需進一步分析。另外以切離葉片觀察 *ko-apx8* 在鹽分處理下之反應，*ko-apx8* 在鹽分處理下黃化現象較嚴重，*oe-apx8* 部分植株幾乎無黃化現象產生，顯示 *OsAPx8* 在鹽分逆境下的確有其重要角色，可能藉由降低 ROS 對植物造成的氧化逆境，提高鹽分耐受性。

在過去的研究指出水稻根部受鹽分處理係透過 ABA 調控並誘導 *OsAPx* 基因表現，*OsAPx8* 也受 ABA 而高度誘導表現，推測 *OsAPx8* 在鹽分逆境下受 ABA 誘導，進一步幫助植物抵抗鹽分逆境，未來可能需在 *ko-apx8* 中進行 *OsAPx8* 基

因補償，觀察是否回復活性以及提高耐受性，來進一步證明 *OsAPx8* 之功能。此外，亦可探討 *OsAPx8* 在其他環境逆境中扮演之角色。



陸、引用文獻

- Abuqamar S, Luo H, Laluk K, Mickelbart MV, Mengiste T** (2009) Crosstalk between biotic and abiotic stress responses in tomato is mediated by the AIM1 transcription factor. *Plant J* **58**: 347-360
- Agrawal GK, Jwa NS, Iwahashi H, Rakwal R** (2003) Importance of ascorbate peroxidases OsAPX1 and OsAPX2 in the rice pathogen response pathways and growth and reproduction revealed by their transcriptional profiling. *Gene* **322**: 93-103
- Ahsan N, Lee DG, Lee SH, Kang KY, Lee JJ, Kim PJ, Yoon HS, Kim JS, Lee BH** (2007) Excess copper induced physiological and proteomic changes in germinating rice seeds. *Chemosphere* **67**: 1182-1193
- Bleeker PM, Assuncao AG, Teiga PM, de Koe T, Verkleij JA** (2002) Revegetation of the acidic, As contaminated Jales mine spoil tips using a combination of spoil amendments and tolerant grasses. *Sci Total Environ* **300**: 1-13
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV** (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot (Lond)* **91**: 179-194
- Borovskii GB, Stupnikova IV, Antipina AI, Vladimirova SV, Voinikov VK** (2002) Accumulation of dehydrin-like proteins in the mitochondria of cereals in response to cold, freezing, drought and ABA treatment. *BMC Plant Biol* **2**: 5-11
- Brouwer KS, van Valen T, Day DA, Lambers H** (1986) Hydroxamate-stimulated O₂ uptake in roots of *Pisum sativum* and *Zea mays*, mediated by a peroxidase : its consequences for respiration measurements. *Plant Physiol* **82**: 236-240
- Chen C, Dickman MB** (2005) Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 3459-3464
- Collin VC, Eymery F, Genty B, Rey P, Havaux M** (2008) Vitamin E is essential for the tolerance of *Arabidopsis thaliana* to metal-induced oxidative stress. *Plant Cell Environ* **31**: 244-257
- Colville L, Smirnoff N** (2008) Antioxidant status, peroxidase activity, and PR protein transcript levels in ascorbate-deficient *Arabidopsis thaliana* vtc mutants. *J Exp Bot* **59**: 3857-3868
- Conklin PL, Last RL** (1995) Differential accumulation of antioxidant mRNAs in

- Arabidopsis thaliana* exposed to ozone. Plant Physiol **109**: 203-212
- Daurelio LD, Checa SK, Moran Barrio J, Ottado J, Orellano EG** (2009) Characterization of *Citrus sinensis* type 1 mitochondrial alternative oxidase and expression analysis in biotic stress. Biosci Rep doi/10.1042/BSR20080180
- Davison PA, Hunter CN, Horton P** (2002) Overexpression of beta-carotene hydroxylase enhances stress tolerance in *Arabidopsis*. Nature **418**: 203-206
- Davletova S, Schlauch K, Coutu J, Mittler R** (2005) The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in *Arabidopsis*. Plant Physiol **139**: 847-856
- del Rio LA, Corpas FJ, Sandalio LM, Palma JM, Gomez M, Barroso JB** (2002) Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. J Exp Bot **53**: 1255-1272
- Escobar C, Hernandez LE, Jimenez A, Creissen G, Ruiz MT, Mullineaux PM** (2003) Transient expression of *Arabidopsis thaliana* ascorbate peroxidase 3 in *Nicotiana benthamiana* plants infected with recombinant potato virus X. Plant Cell Rep **21**: 699-704
- Evenson RE** (1999) Global and local implications of biotechnology and climate change for future food supplies. Proc Natl Acad Sci U S A **96**: 5921-5928
- Francia D, Demaria D, Calderini O, Ferraris L, Valentino D, Arcioni S, Tamietti G, Cardinale F** (2007) Wounding induces resistance to pathogens with different lifestyles in tomato: role of ethylene in cross-protection. Plant Cell Environ **30**: 1357-1365
- Fryer MJ, Ball L, Oxborough K, Karpinski S, Mullineaux PM, Baker NR** (2003) Control of Ascorbate Peroxidase 2 expression by hydrogen peroxide and leaf water status during excess light stress reveals a functional organisation of *Arabidopsis* leaves. Plant J **33**: 691-705
- Ganesan V, Thomas G** (2001) Salicylic acid response in rice: influence of salicylic acid on H₂O₂ accumulation and oxidative stress. Plant Sci **160**: 1095-1106
- Gao Q, Zhang L** (2008) Ultraviolet-B-induced oxidative stress and antioxidant defense system responses in ascorbate-deficient *vtc1* mutants of *Arabidopsis thaliana*. J Plant Physiol **165**: 138-148
- Gessler NN, Aver'yanov AA, Belozerskaya TA** (2007) Reactive oxygen species in regulation of fungal development. Biochemistry (Mosc) **72**: 1091-1109
- Giacomelli L, Masi A, Ripoll DR, Lee MJ, van Wijk KJ** (2007) *Arabidopsis*

- thaliana* deficient in two chloroplast ascorbate peroxidases shows accelerated light-induced necrosis when levels of cellular ascorbate are low. *Plant Mol Biol* **65**: 627-644
- Giuliano G, Tavazza R, Diretto G, Beyer P, Taylor MA** (2008) Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Biotechnol* **26**: 139-145
- Groten K, Dutilleul C, van Heerden PD, Vanacker H, Bernard S, Finkemeier I, Dietz KJ, Foyer CH** (2006) Redox regulation of peroxiredoxin and proteinases by ascorbate and thiols during pea root nodule senescence. *FEBS Lett* **580**: 1269-1276
- Hong CY, Hsu YT, Tsai YC, Kao CH** (2007) Expression of ASCORBATE PEROXIDASE 8 in roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings in response to NaCl. *J Exp Bot* **58**: 3273-3283
- Jiang C, Xu J, Zhang H, Zhang X, Shi J, Li M, Ming F** (2009) A cytosolic class I small heat shock protein, RchSP17.8, of *Rosa chinensis* confers resistance to a variety of stresses to *Escherichia coli*, yeast and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* doi/10.1111/j.1365-3040.2009.01987.x
- Jimenez A, Hernandez JA, Del Rio LA, Sevilla F** (1997) Evidence for the Presence of the Ascorbate-Glutathione Cycle in Mitochondria and Peroxisomes of Pea Leaves. *Plant Physiol* **114**: 275-284
- Kaminaka H, Morita S, Tokumoto M, Masumura T, Tanaka K** (1999) Differential gene expressions of rice superoxide dismutase isoforms to oxidative and environmental stresses. *Free Radic Res* **31 Suppl**: S219-225
- Karpinski S, Escobar C, Karpinska B, Creissen G, Mullineaux PM** (1997) Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in *Arabidopsis* during excess light stress. *Plant Cell* **9**: 627-640
- Kelly M, Buchanan-Smith M** (1994) Northern Sudan in 1991: food crisis and the international relief response. *Disasters* **18**: 16-34
- Kim DW, Rakwal R, Agrawal GK, Jung YH, Shibato J, Jwa NS, Iwahashi Y, Iwahashi H, Kim DH, Shim le S, Usui K** (2005) A hydroponic rice seedling culture model system for investigating proteome of salt stress in rice leaf. *Electrophoresis* **26**: 4521-4539
- Koussevitzky S, Suzuki N, Huntington S, Armijo L, Sha W, Cortes D, Shulaev V, Mittler R** (2008) Ascorbate peroxidase 1 plays a key role in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination. *J Biol Chem*

- 283:** 34197-34203
- Kubo A, Saji H, Tanaka K, Kondo N** (1995) Expression of *Arabidopsis* cytosolic ascorbate peroxidase gene in response to ozone or sulfur dioxide. *Plant Mol Biol* **29:** 479-489
- Lal S, Gulyani V, Khurana P** (2008) Overexpression of *HVA1* gene from barley generates tolerance to salinity and water stress in transgenic mulberry (*Morus indica*). *Transgenic Res* **17:** 651-663
- Laloi C, Stachowiak M, Pers-Kamczyc E, Warzych E, Murgia I, Apel K** (2007) Cross-talk between singlet oxygen- and hydrogen peroxide-dependent signaling of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104:** 672-677
- Liu X, Bai X, Wang X, Chu C** (2007) OsWRKY71, a rice transcription factor, is involved in rice defense response. *J Plant Physiol* **164:** 969-979
- Lu Z, Liu D, Liu S** (2007) Two rice cytosolic ascorbate peroxidases differentially improve salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep* **26:** 1909-1917
- Magbanua ZV, De Moraes CM, Brooks TD, Williams WP, Luthe DS** (2007) Is catalase activity one of the factors associated with maize resistance to *Aspergillus flavus*? *Mol Plant Microbe Interact* **20:** 697-706
- Meerburg BG, Singleton GR, Leirs H** (2009) The year of the rat ends- time to fight hunger. *Pest Manag Sci* **65:** 351-352
- Mellway RD, Tran LT, Prouse MB, Campbell MM, Constabel CP** (2009) The wound-, pathogen-, and ultraviolet B-responsive MYB134 gene encodes an R2R3 MYB transcription factor that regulates proanthocyanidin synthesis in *Poplar*. *Plant Physiol* **150:** 924-941
- Miller G, Suzuki N, Rizhsky L, Hegde A, Koussevitzky S, Mittler R** (2007) Double mutants deficient in cytosolic and thylakoid ascorbate peroxidase reveal a complex mode of interaction between reactive oxygen species, plant development, and response to abiotic stresses. *Plant Physiol* **144:** 1777-1785
- Minibayeva F, Kolesnikov O, Chasov A, Beckett RP, Luthje S, Vylegzhanova N, Buck F, Bottger M** (2009) Wound-induced apoplastic peroxidase activities: their roles in the production and detoxification of reactive oxygen species. *Plant Cell Environ* **32:** 497-508
- Mittler R** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* **7:** 405-410
- Mittler R** (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci* **11:** 15-19

- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F** (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* **9**: 490-498
- Moreno DA, Villora G, Ruiz JM, Romero L** (2003) Growth conditions, elemental accumulation and induced physiological changes in Chinese cabbage. *Chemosphere* **52**: 1031-1040
- Munns R, Tester M** (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 651-681
- Narendra S, Venkataramani S, Shen G, Wang J, Pasapula V, Lin Y, Konyeyev D, Holaday AS, Zhang H** (2006) The *Arabidopsis* ascorbate peroxidase 3 is a peroxisomal membrane-bound antioxidant enzyme and is dispensable for *Arabidopsis* growth and development. *J Exp Bot* **57**: 3033-3042
- Nishizawa A, Yabuta Y, Yoshida E, Maruta T, Yoshimura K, Shigeoka S** (2006) *Arabidopsis* heat shock transcription factor A2 as a key regulator in response to several types of environmental stress. *Plant J* **48**: 535-547
- Nohzadeh Malakshah S, Habibi Rezaei M, Heidari M, Salekdeh GH** (2007) Proteomics reveals new salt responsive proteins associated with rice plasma membrane. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**: 2144-2154
- Norton GJ, Lou-Hing DE, Meharg AA, Price AH** (2008) Rice-arsenate interactions in hydroponics: whole genome transcriptional analysis. *J Exp Bot* **59**: 2267-2276
- Panchuk, II, Volkov RA, Schöffl F** (2002) Heat stress- and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **129**: 838-853
- Panchuk, II, Zentgraf U, Volkov RA** (2005) Expression of the APx gene family during leaf senescence of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **222**: 926-932
- Pavet V, Olmos E, Kiddle G, Mowla S, Kumar S, Antoniw J, Alvarez ME, Foyer CH** (2005) Ascorbic acid deficiency activates cell death and disease resistance responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **139**: 1291-1303
- Peng S, Huang J, Sheehy JE, Laza RC, Visperas RM, Zhong X, Centeno GS, Khush GS, Cassman KG** (2004) Rice yields decline with higher night temperature from global warming. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 9971-9975
- Prashanth SR, Sadhasivam V, Parida A** (2008) Over expression of cytosolic copper/zinc superoxide dismutase from a mangrove plant *Avicennia marina* in indica rice var Pusa Basmati-1 confers abiotic stress tolerance. *Transgenic Res* **17**: 281-291

- Rapala-Kozik M, Kowalska E, Ostrowska K** (2008) Modulation of thiamine metabolism in *Zea mays* seedlings under conditions of abiotic stress. *J Exp Bot* **59**: 4133-4143
- Remington R, Simms C** (2002) Nuts to the fuel crisis! *Biologist (London)* **49**: 96
- Rodriguez RE, Lodeyro A, Poli HO, Zurbriggen M, Peisker M, Palatnik JF, Tognetti VB, Tschiersch H, Hajirezaei MR, Valle EM, Carrillo N** (2007) Transgenic tobacco plants overexpressing chloroplastic ferredoxin-NADP(H) reductase display normal rates of photosynthesis and increased tolerance to oxidative stress. *Plant Physiol* **143**: 639-649
- Roldan-Arjona T, Ariza RR** (2009) Repair and tolerance of oxidative DNA damage in plants. *Mutat Res* **681**: 169-179
- Romero-Puertas MC, Corpas FJ, Sandalio LM, Leterrier M, Rodriguez-Serrano M, del Rio LA, Palma JM** (2006) Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme. *New Phytol* **170**: 43-52
- Rosset JB, Walter PB, Hendrickson L, Chow WS, Poole A, Mullineaux PM, Pogson BJ** (2006) A mutation affecting ascorbate peroxidase 2 gene expression reveals a link between responses to high light and drought tolerance. *Plant Cell Environ* **29**: 269-281
- Schneider K, Garrett L** (2009) The end of the era of generosity? Global health amid economic crisis. *Philos Ethics Humanit Med* **4**: 1
- Schutzendubel A, Polle A** (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Exp Bot* **53**: 1351-1365
- Shi WM, Muramoto Y, Ueda A, Takabe T** (2001) Cloning of peroxisomal ascorbate peroxidase gene from barley and enhanced thermotolerance by overexpressing in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **273**: 23-27
- Storozhenko S, De Pauw P, Van Montagu M, Inze D, Kushnir S** (1998) The heat-shock element is a functional component of the *Arabidopsis APX1* gene promoter. *Plant Physiol* **118**: 1005-1014
- Taylor NL, Millar AH** (2007) Oxidative stress and plant mitochondria. *Methods Mol Biol* **372**: 389-403
- Teixeira FK, Menezes-Benavente L, Galvao VC, Margis R, Margis-Pinheiro M** (2006) Rice ascorbate peroxidase gene family encodes functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments. *Planta* **224**: 300-314
- Teixeira FK, Menezes-Benavente L, Margis R, Margis-Pinheiro M** (2004) Analysis of the molecular evolutionary history of the ascorbate peroxidase

- gene family: inferences from the rice genome. *J Mol Evol* **59**: 761-770
- Thunell S, Andersson D, Harper P, Henrichson A, Floderus Y, Lindh U** (1997) Effects of administration of antioxidants in acute intermittent porphyria. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* **35**: 427-433
- Torabi S, Wissuwa M, Heidari M, Naghavi MR, Gilany K, Hajirezaei MR, Omidi M, Yazdi-Samadi B, Ismail AM, Salekdeh GH** (2009) A comparative proteome approach to decipher the mechanism of rice adaptation to phosphorous deficiency. *Proteomics* **9**: 159-170
- Tsai YC, Hong CY, Liu LF, Kao CH** (2005) Expression of ascorbate peroxidase and glutathione reductase in roots of rice seedlings in response to NaCl and H₂O₂. *J Plant Physiol* **162**: 291-299
- Tunnacliffe A, Wise MJ** (2007) The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften* **94**: 791-812
- Vacca RA, de Pinto MC, Valenti D, Passarella S, Marra E, De Gara L** (2004) Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco Bright-Yellow 2 cells. *Plant Physiol* **134**: 1100-1112
- Verbruggen N, Hermans C** (2008) Proline accumulation in plants: a review. *Amino acids* **353**: 753-759
- Volkov RA, Panchuk, II, Mullineaux PM, Schoffl F** (2006) Heat stress-induced H₂O₂ is required for effective expression of heat shock genes in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **61**: 733-746
- Wan C, Li S, Wen L, Kong J, Wang K, Zhu Y** (2007) Damage of oxidative stress on mitochondria during microspores development in Honglian CMS line of rice. *Plant Cell Rep* **26**: 373-382
- Wang F, Zeng B, Sun Z, Zhu C** (2009) Relationship between proline and Hg²⁺-induced oxidative stress in a tolerant rice mutant. *Arch Environ Contam Toxicol* **56**: 723-731
- Wang L, Huang X, Zhou Q** (2009) Protective effect of rare earth against oxidative stress under ultraviolet-B radiation. *Biol Trace Elem Res* **128**: 82-93
- Wang W, Vinocur B, Altman A** (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* **218**: 1-14
- Wu SC, Yen GC** (2004) Effects of cooking oil fumes on the genotoxicity and oxidative stress in human lung carcinoma (A-549) cells. *Toxicol In Vitro* **18**: 571-580

- Xu X, Zhou Y, Wei S, Ren D, Yang M, Bu H, Kang M, Wang J, Feng J** (2009)
Molecular cloning and expression of a Cu/Zn-containing superoxide
dismutase from *Thellungiella halophila*. *Mol Cells* **27**: 423-428
- Zhang H, Wang J, Nickel U, Allen RD, Goodman HM** (1997) Cloning and
expression of an *Arabidopsis* gene encoding a putative peroxisomal
ascorbate peroxidase. *Plant Mol Biol* **34**: 967-971



附表 1、阿拉伯芥中 *APx* 基因調控及功能之研究

Gene regulation

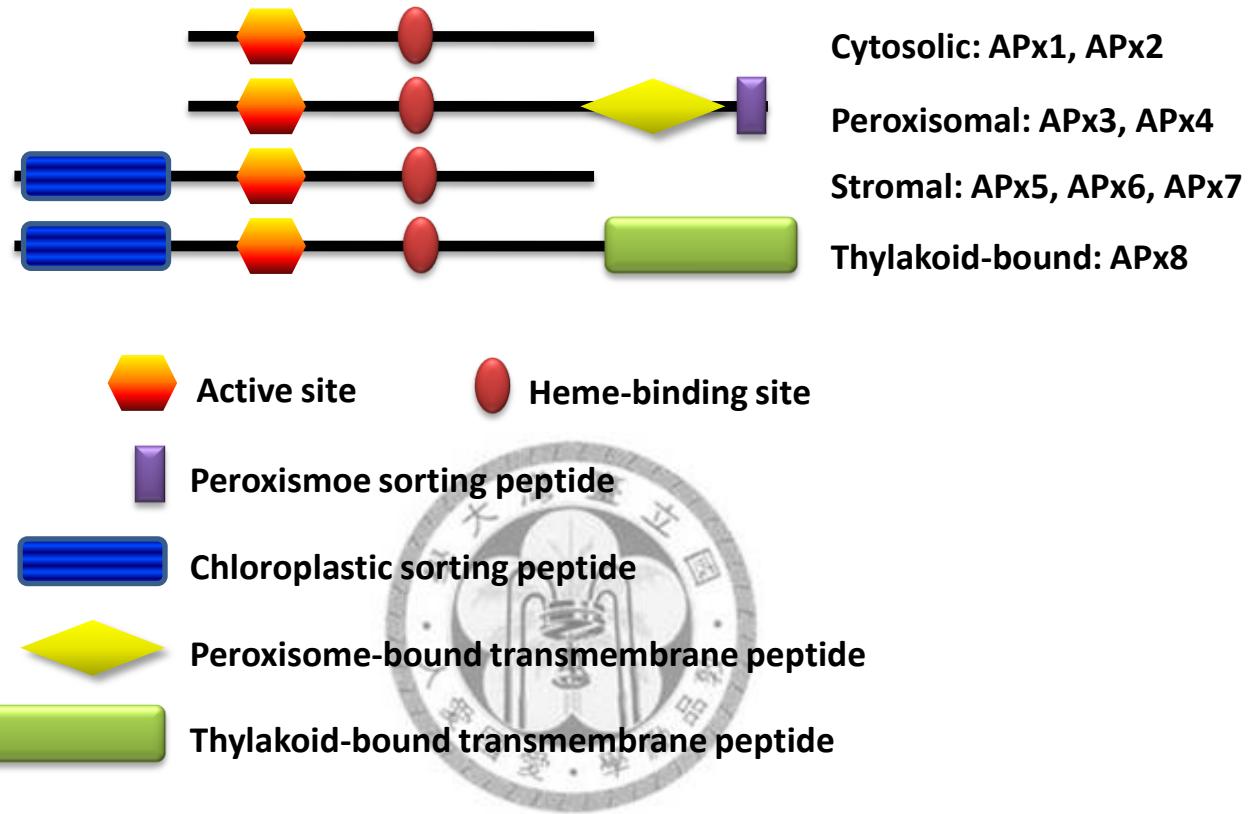
Arabidopsis thaliana

<i>AtAPx1</i>	Drought, heat	Koussevitzky <i>et al.</i> , 2008
	heat	Panchuk <i>et al.</i> , 2002; Volkov <i>et al.</i> , 2006
	photoinhibition	Karpinski <i>et al.</i> , 1997
	ozone	Kubo <i>et al.</i> , 1995; Conklin <i>et al.</i> , 1995
<i>AtAPx2</i>	heat	Panchuk <i>et al.</i> , 2002; Volkov <i>et al.</i> , 2006
	ABA, drought, high light	Rossel <i>et al.</i> , 2006
	high light, leaf transpiration rate	Fryer <i>et al.</i> , 2003
	photoinhibition	Karpinski <i>et al.</i> , 1997
<i>AtAPx3</i>	cold, UV light, H_2O_2 , paraquat	Zhang <i>et al.</i> , 1997
<i>AtAPx4</i>	leaf senescence	Panchuk <i>et al.</i> , 2005
<i>AtAPx5</i>		
<i>AtAPx6</i>		
<i>AtAPx7</i>		
<i>AtAPx8 (tAPx)</i>	oxidative stress	Laloi <i>et al.</i> , 2007
	leaf senescence	Panchuk <i>et al.</i> , 2005
	flowering	Lokhande <i>et al.</i> , 2003
<i>AtAPx9 (sAPx)</i>		

Gene function

Arabidopsis thaliana

<i>AtAPx1</i>	(ko) sensitive to oxidative stress enhance photo-oxidative stress tolerance	Miller <i>et al.</i> , 2007 Ishikawa <i>et al.</i> , 2008
<i>AtAPx2</i>	enhance photo-oxidative stress tolerance	Ishikawa <i>et al.</i> , 2008
<i>AtAPx3</i>	(oe) enhance oxidative stress tolerance	Wang <i>et al.</i> , 1999
<i>AtAPx4</i>		
<i>AtAPx5</i>		
<i>AtAPx6</i>		
<i>AtAPx7</i>		
<i>AtAPx8 (tAPx)</i>	(ko) accelerates light-induced necrosis (ko) enhances paraquat-induced photooxidative stress and nitric oxide-induced cell death	Giacomelli <i>et al.</i> , 2007 Tarantino <i>et al.</i> , 2005
<i>AtAPx9 (sAPx)</i>	(ko) accelerates light-induced necrosis	Giacomelli <i>et al.</i> , 2007



附圖1、水稻APx保守性序列示意图
 參考2006年Teixeira等人研究繪製而成。

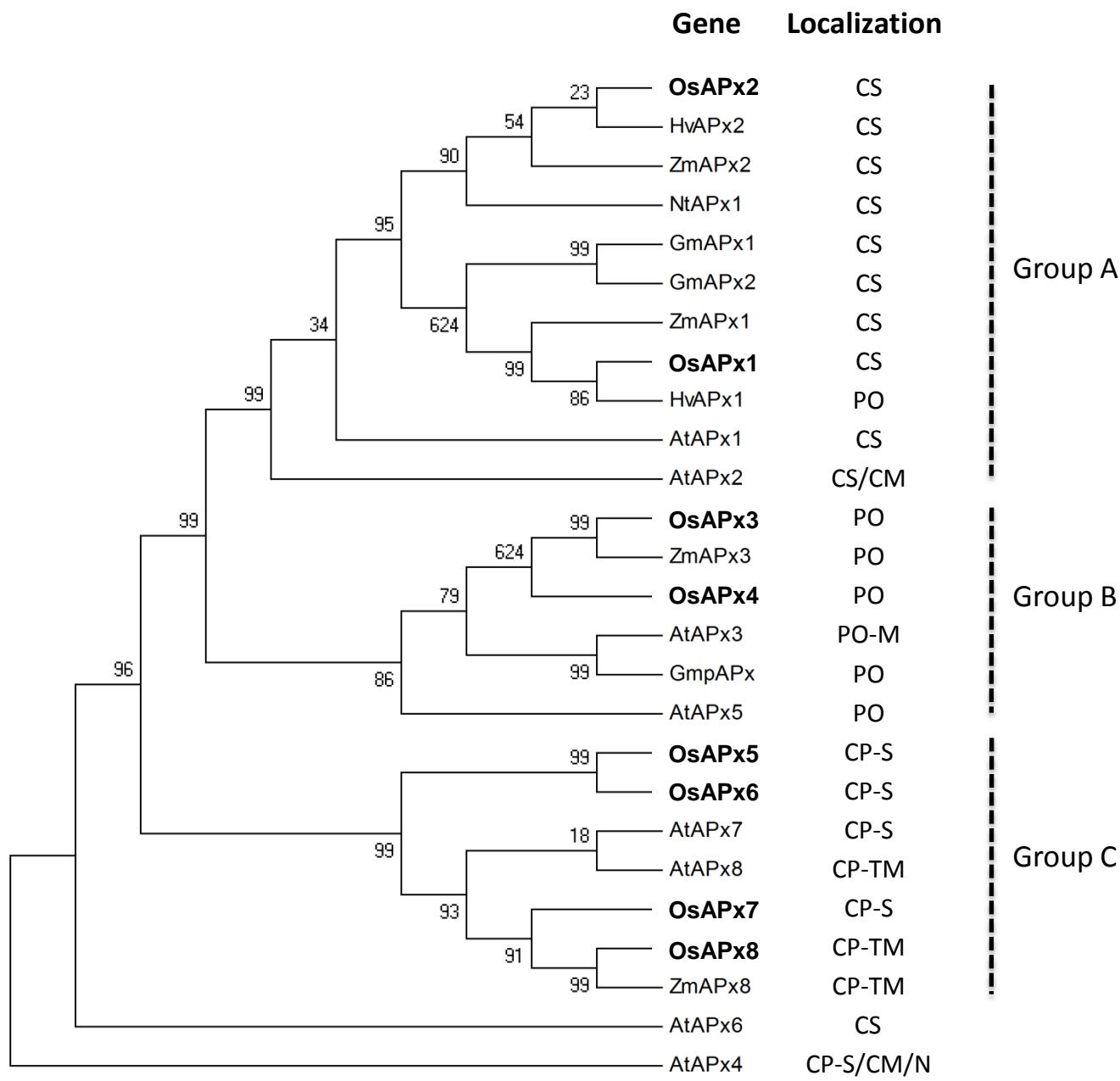


圖1、APx基因家族親緣演化分析

選取水稻、阿拉伯芥各8個APx基因及其他物種已知APx基因以胺基酸序列比對，利用MEGA 4.0軟體進行分析，次細胞位置參考文獻及利用訊息勝肽搜尋網站(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)。各物種縮寫如下，Os: *Oryza sativa*；Hv: *Hordeum vulgare*；Zm: *Zea mays*；Nt: *Nicotiana tabacum*；At: *Arabidopsis thaliana*；Gm: *Glycine max*。利用訊息勝肽分析基因次細胞定位，縮寫代表如下，CS: Cytosol；PO: Peroxisome；PO-M: Peroxisomal membrane；CM: Cytoplasm；CP-S: Chloroplast stroma；CP-TM: Chloroplast thylakoid membrane；N: Nucleus。

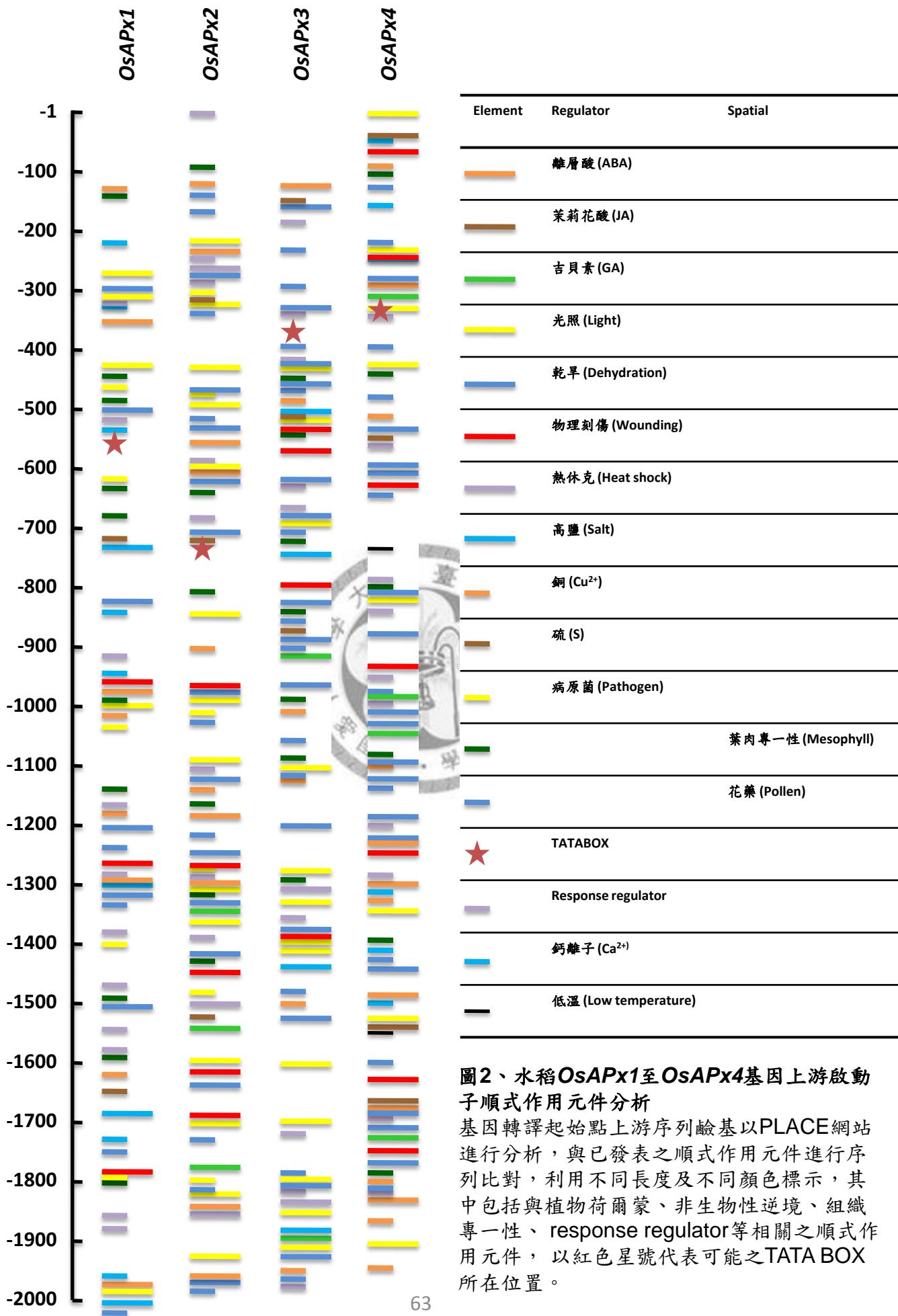


圖2、水稻*OsAPx1*至*OsAPx4*基因上游啟動子順式作用元件分析

基因轉譯起始點上游序列鹼基以PLACE網站進行分析，與已發表之順式作用元件進行序列比對，利用不同長度及不同顏色標示，其中包括與植物荷爾蒙、非生物性逆境、組織專一性、response regulator等相關之順式作用元件，以紅色星號代表可能之TATA BOX所在位置。

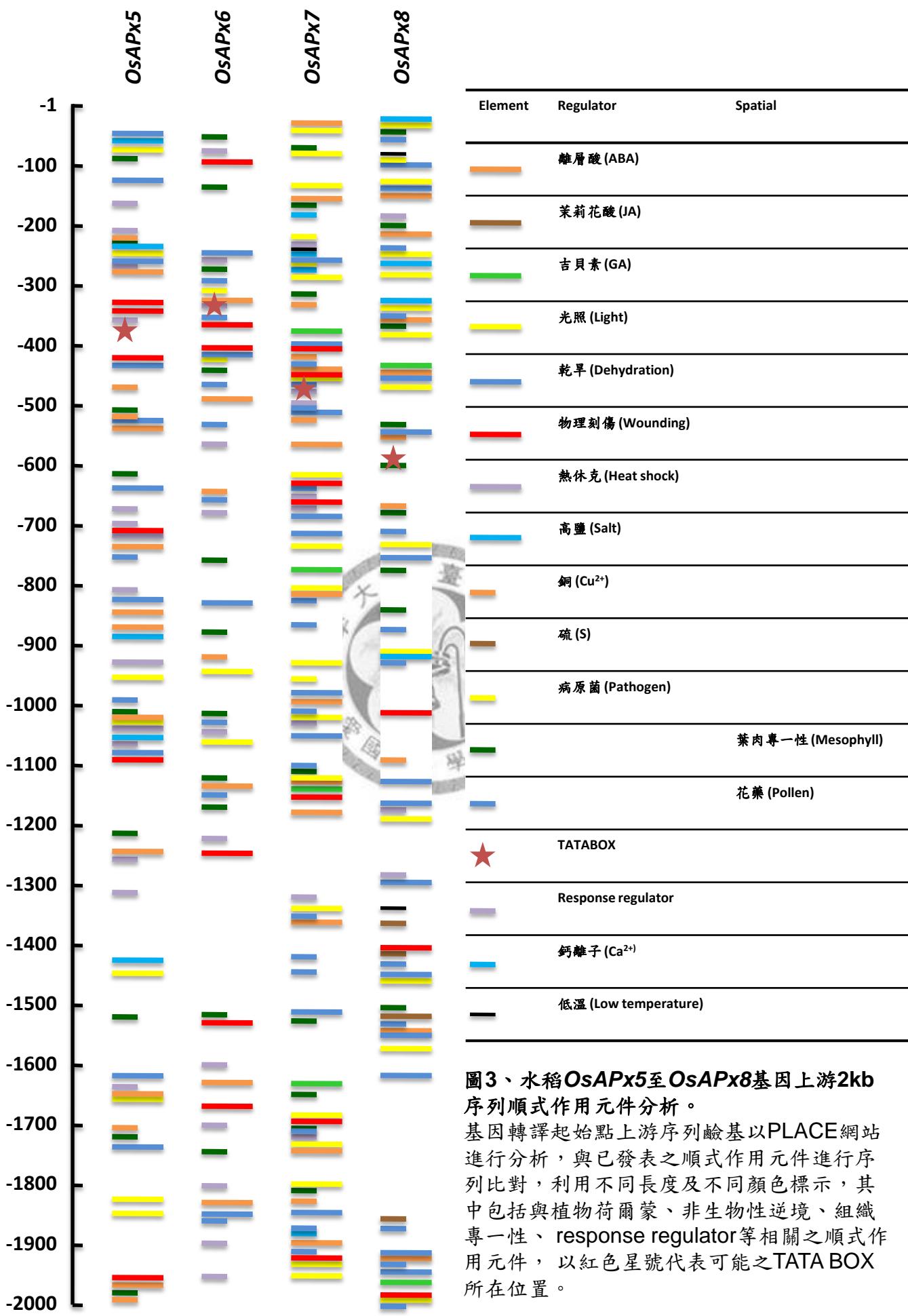


圖3、水稻 *OsAPx5* 至 *OsAPx8* 基因上游2kb 序列順式作用元件分析。

基因轉譯起始點上游序列鹼基以PLACE網站進行分析，與已發表之順式作用元件進行序列比對，利用不同長度及不同顏色標示，其中包括與植物荷爾蒙、非生物性逆境、組織專一性、response regulator等相關之順式作用元件，以紅色星號代表可能之TATA BOX所在位置。

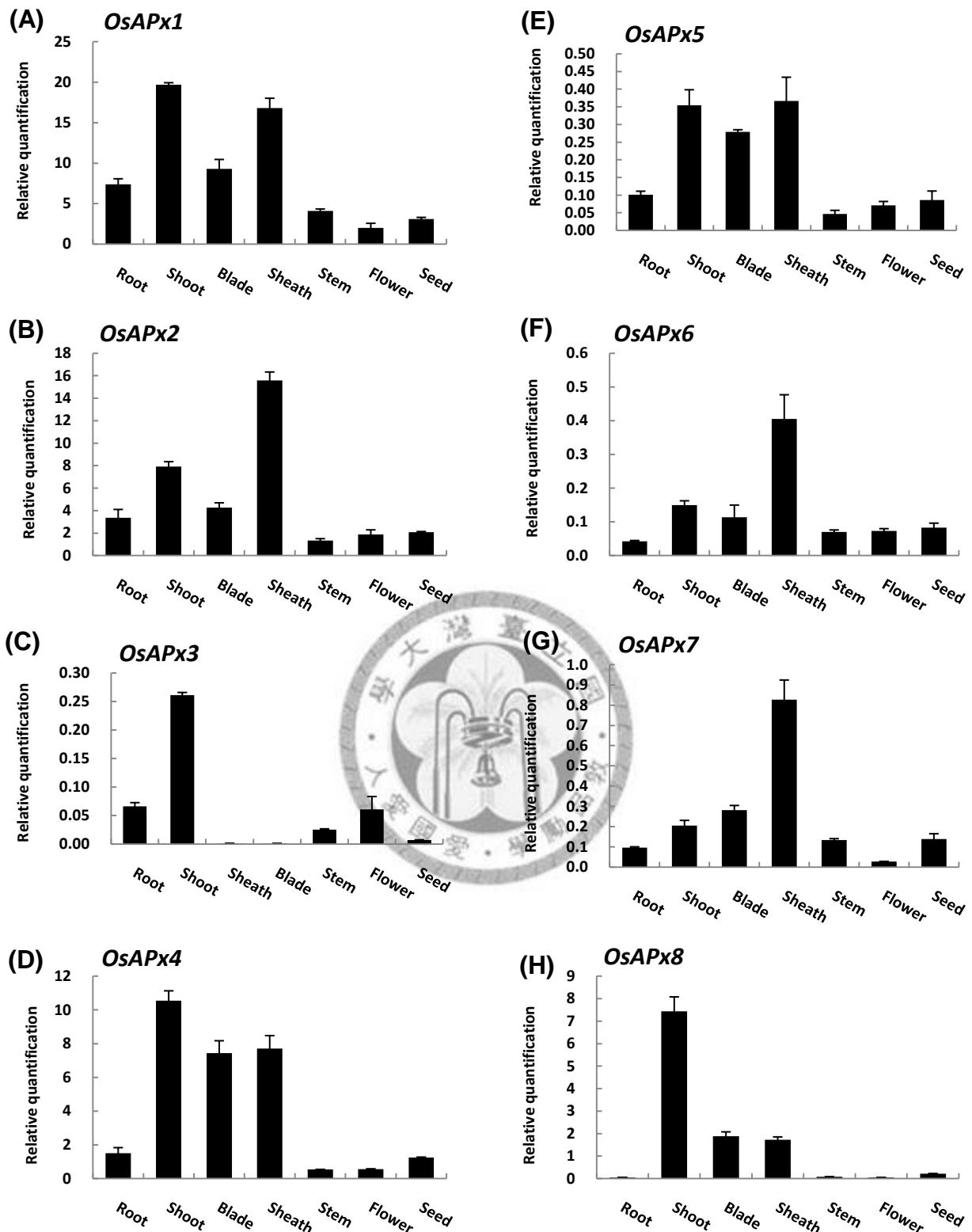


圖4、APx基因家族在水稻中之組織專一性表現分析。

以TNG67為植物材料，在水稻兩週大幼苗時期收取根部 (root)與地上部 (shoot)，於孕穗期 (花序約一公分)收取葉片 (blade)、葉鞘 (sheath)、莖部 (stem)、與未成熟花 (flower)，種子材料 (seed) 為糊熟期的胚及糊粉層，樣品收集後萃取RNA並合成第一股cDNA，接著以即時定量聚合酶連鎖反應偵測*OsAPx*基因家族在不同處理下基因表現，並以*OsActin*作為校正用之內部控制組，偵測基因相對表現量，取三次重複平均值作圖，並以standard deviation繪製誤差線。

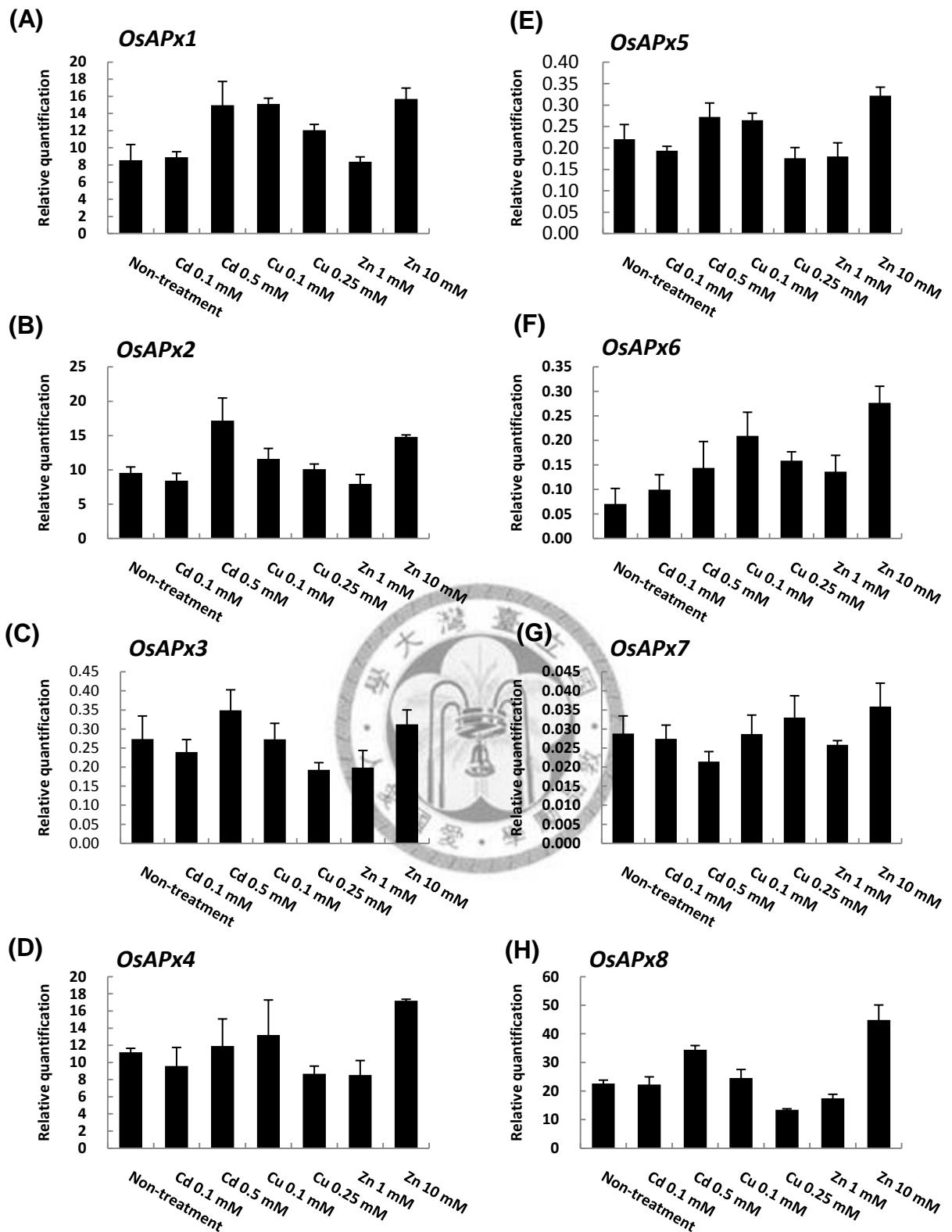


圖5、TNG67水稻地上部在鎘、銅、鋅處理下APx家族之基因表現。

以水耕系統種植TNG67兩週大，分別於水耕液中添加0.1 mM、0.5 mM 鎘($CdCl_2$)、0.1 mM、0.25 mM 銅($CuSO_4$)、1 mM、10 mM 鋅($ZnSO_4$)處理6小時，觀察APx基因家族之基因表現。樣品收集後萃取RNA並合成第一股cDNA，接著以即時定量聚合酶連鎖反應偵測OsAPx基因家族在不同處理下基因表現，並以OsActin作為校正用之內部控制組，偵測基因相對表現量，取三次重複平均值作圖，並以standard deviation繪製誤差線。

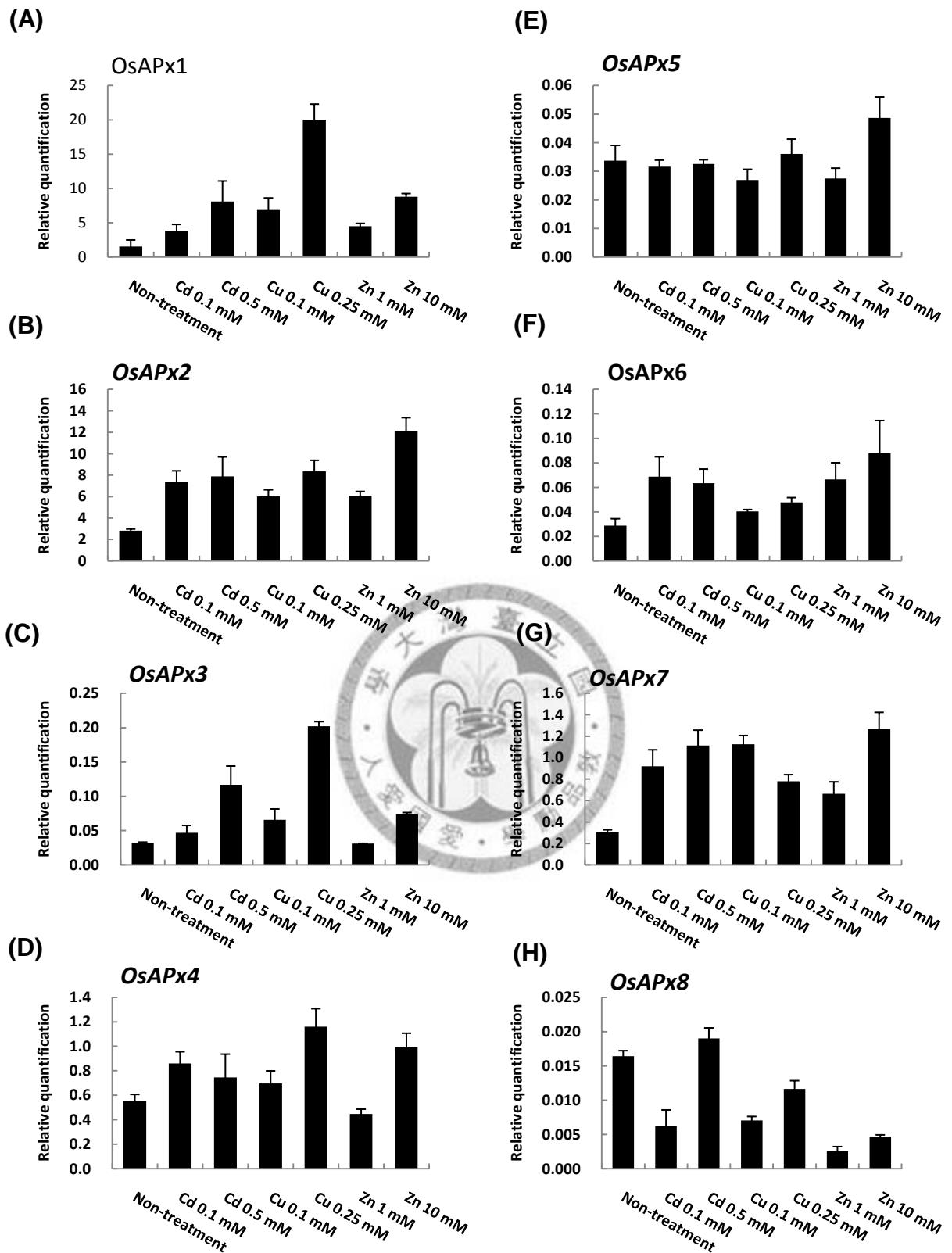


圖6、TNG67水稻根部在鎘、銅、鋅處理下APx家族之基因表現。

以水耕系統種植TNG67至兩週大，分別於水耕液中添加0.1 mM、0.5 mM 鎘($CdCl_2$)、0.1 mM、0.25 mM 銅($CuSO_4$)、1 mM、10 mM 鋅($ZnSO_4$)處理6小時，觀察APx基因家族之基因表現。樣品收集後萃取RNA並合成第一股cDNA，接著以即時定量聚合酶連鎖反應偵測OsAPx基因家族在不同處理下基因表現，並以OsActin作為校正用之內部控制組，偵測基因相對表現量，取三次重複平均值作圖，並以standard deviation繪製誤差線。

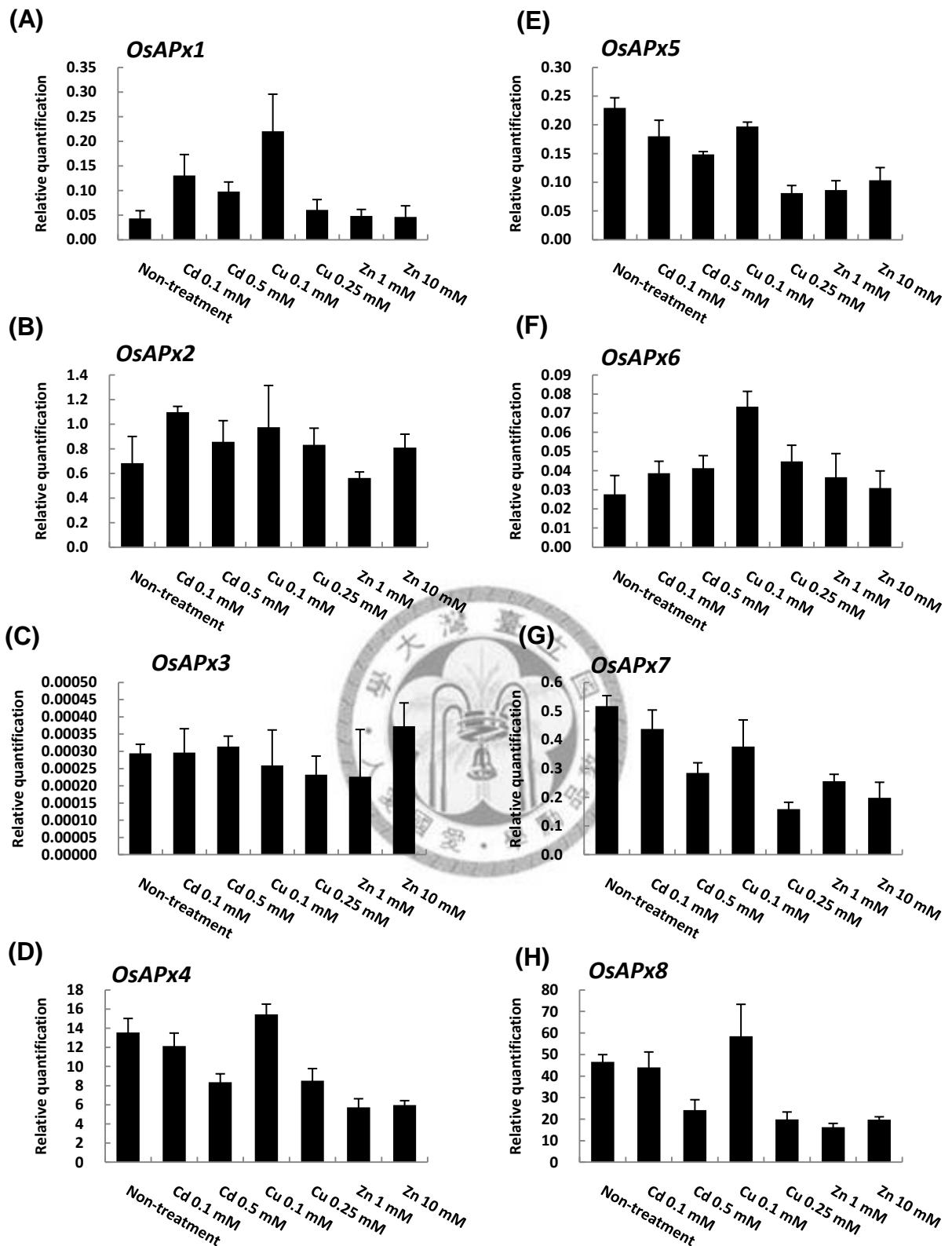
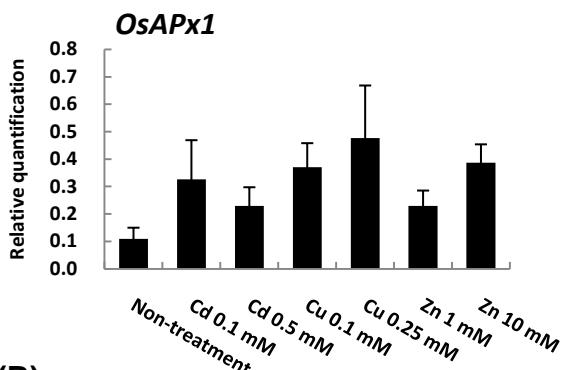


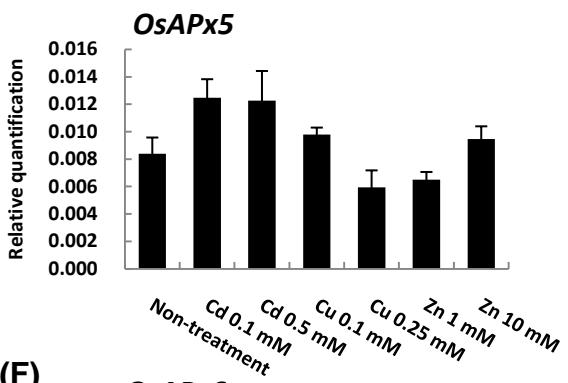
圖7、TN1水稻地上部在鎘、銅、鋅處理下APx家族之基因表現。

以水耕系統種植TN1至兩週大，分別於水耕液中添加0.1 mM、0.5 mM 鎘 ($CdCl_2$)、0.1 mM、0.25 mM 銅 ($CuSO_4$)、1 mM、10 mM 鋅 ($ZnSO_4$)處理6小時，觀察APx基因家族之基因表現。樣品收集後萃取RNA並合成第一股cDNA，接著以即時定量聚合酶連鎖反應偵測OsAPx基因家族在不同處理下基因表現，並以OsActin作為校正用之內部控制組，偵測基因相對表現量，取三次重複平均值作圖，並以standard deviation繪製誤差線。

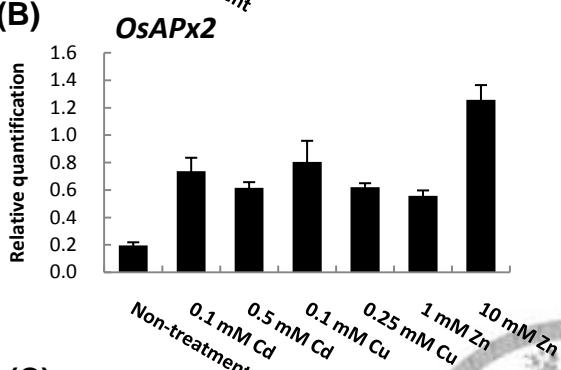
(A)



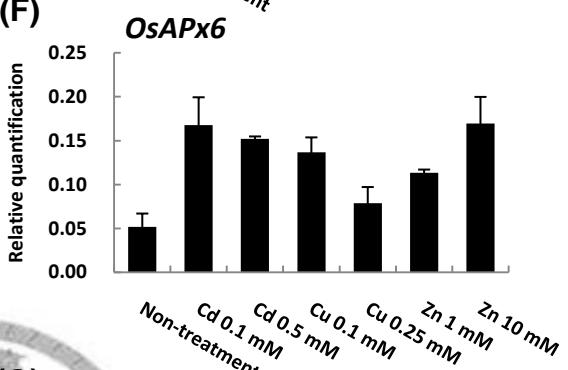
(E)



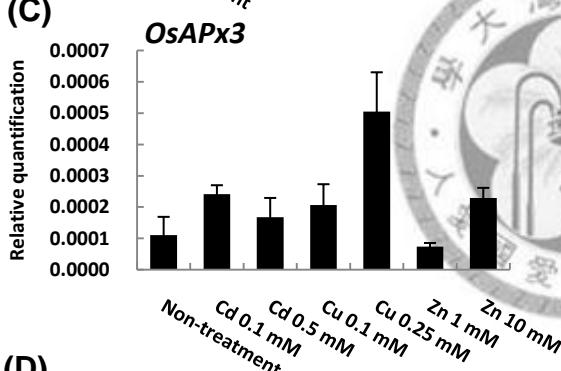
(B)



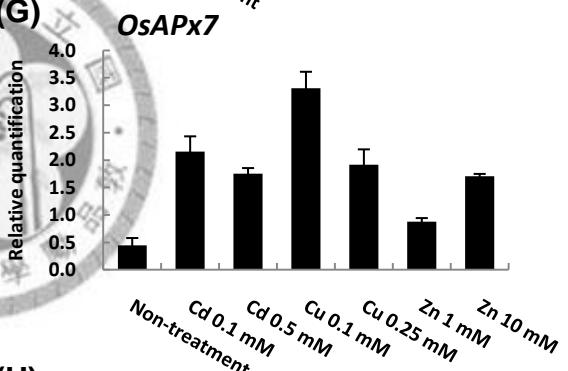
(F)



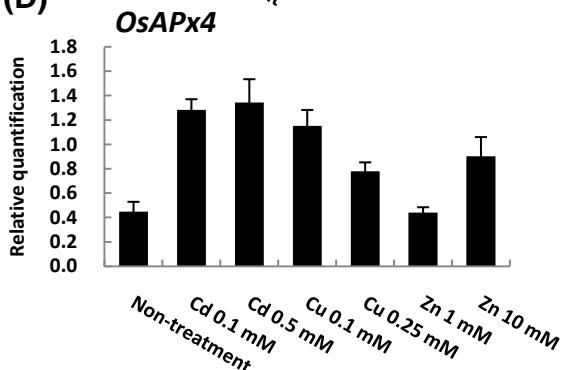
(C)



(G)



(D)



(H)

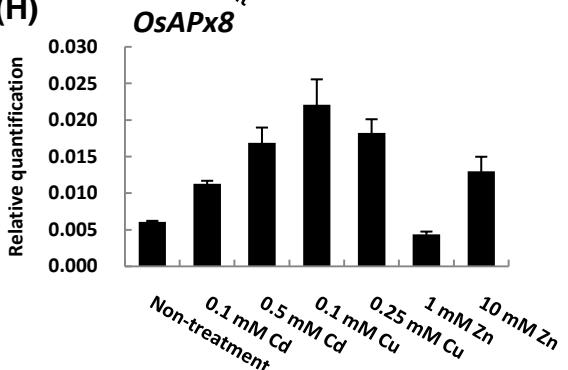


圖8、TN1水稻根部在鎘、銅、鋅處理下APx家族之基因表現。

以水耕系統種植TN1至兩週大，分別於水耕液中添加0.1 mM、0.5 mM 鎘 (CdCl_2)、0.1 mM、0.25 mM 銅 (CuSO_4)、1 mM、10 mM 鋅 (ZnSO_4)處理6小時，分析APx基因家族之基因表現。樣品收集後萃取RNA並合成第一股cDNA，接著以即時定量聚合酶連鎖反應偵測OsAPx基因家族在不同處理下基因表現，並以OsActin作為校正用之內部控制組，偵測基因相對表現量，取三次重複平均值作圖，並以standard deviation繪製誤差線。

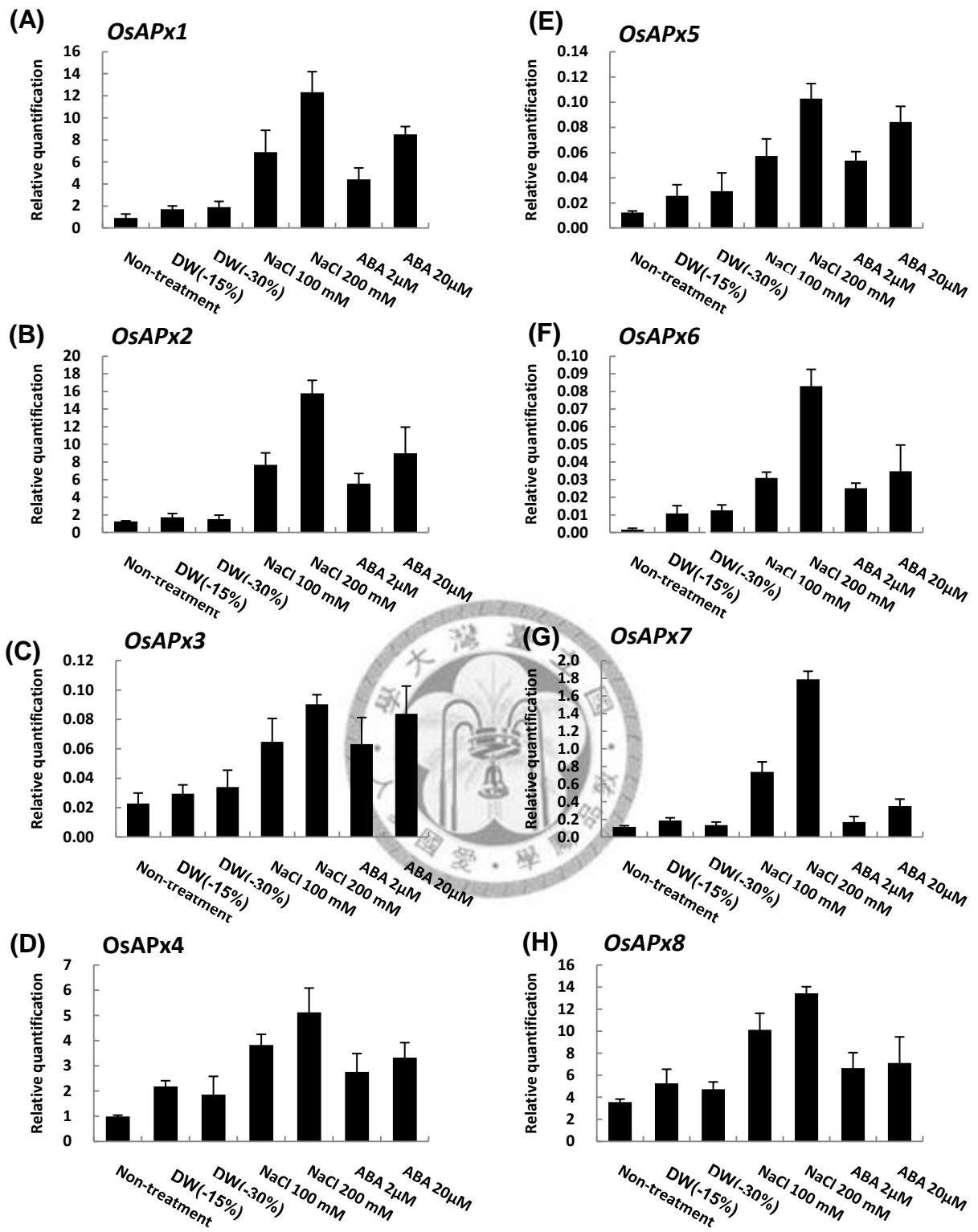


圖9、TNG67水稻地上部在缺水、高鹽逆境及ABA處理下APx家族之基因表現。

取兩週大水耕栽培的TNG67水稻幼苗進行處理，缺水逆境係以鮮重減少15%、30%，高鹽逆境以100 mM、200 mM NaCl處理24小時，ABA處理係以2 μM、20 μM處理24小時後收取水稻地上部。樣品收集後萃取RNA並合成第一股cDNA，接著以即時定量聚合酶連鎖反應偵測*OsAPx*基因家族在不同處理下基因表現，並以*OsActin*作為校正用之內部控制組，偵測基因相對表現量，取三次重複平均值作圖，並以standard deviation繪製誤差線。

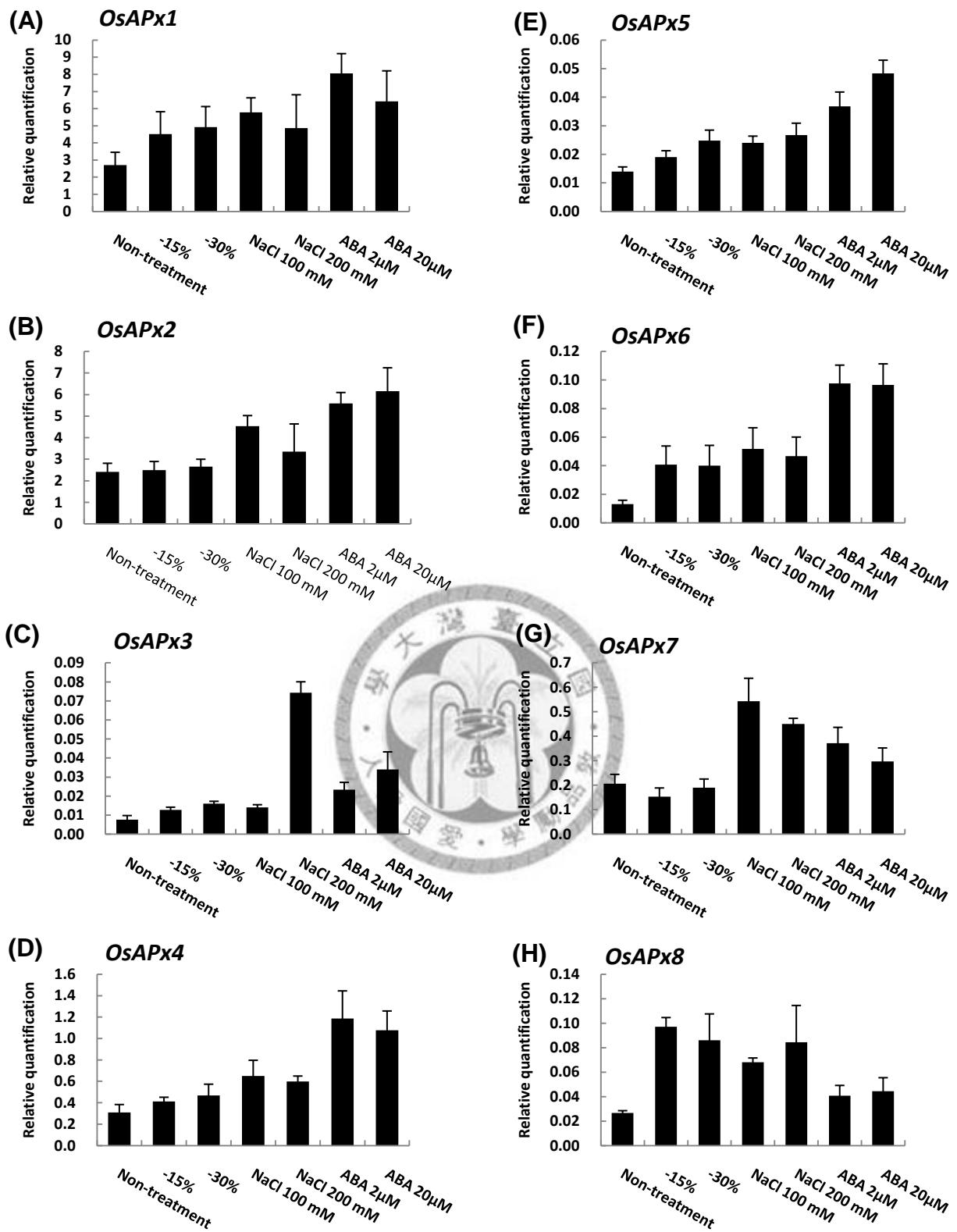


圖10、TNG67水稻根部在缺水、高鹽逆境及ABA處理下APx家族之基因表現。

取兩週大水耕栽培的TNG67水稻幼苗進行處理，缺水逆境係以鮮重減少15%、30%，高鹽逆境以100 mM、200 mM NaCl處理24小時，ABA處理係以2 μM、20 μM處理24小時後收取水稻根部。樣品收集後萃取RNA並合成第一股cDNA，接著以即時定量聚合酶連鎖反應偵測OsAPx基因家族在不同處理下基因表現，並以OsActin作為校正用之內部控制組，偵測基因相對表現量，取三次重複平均值作圖，並以standard deviation繪製誤差線。

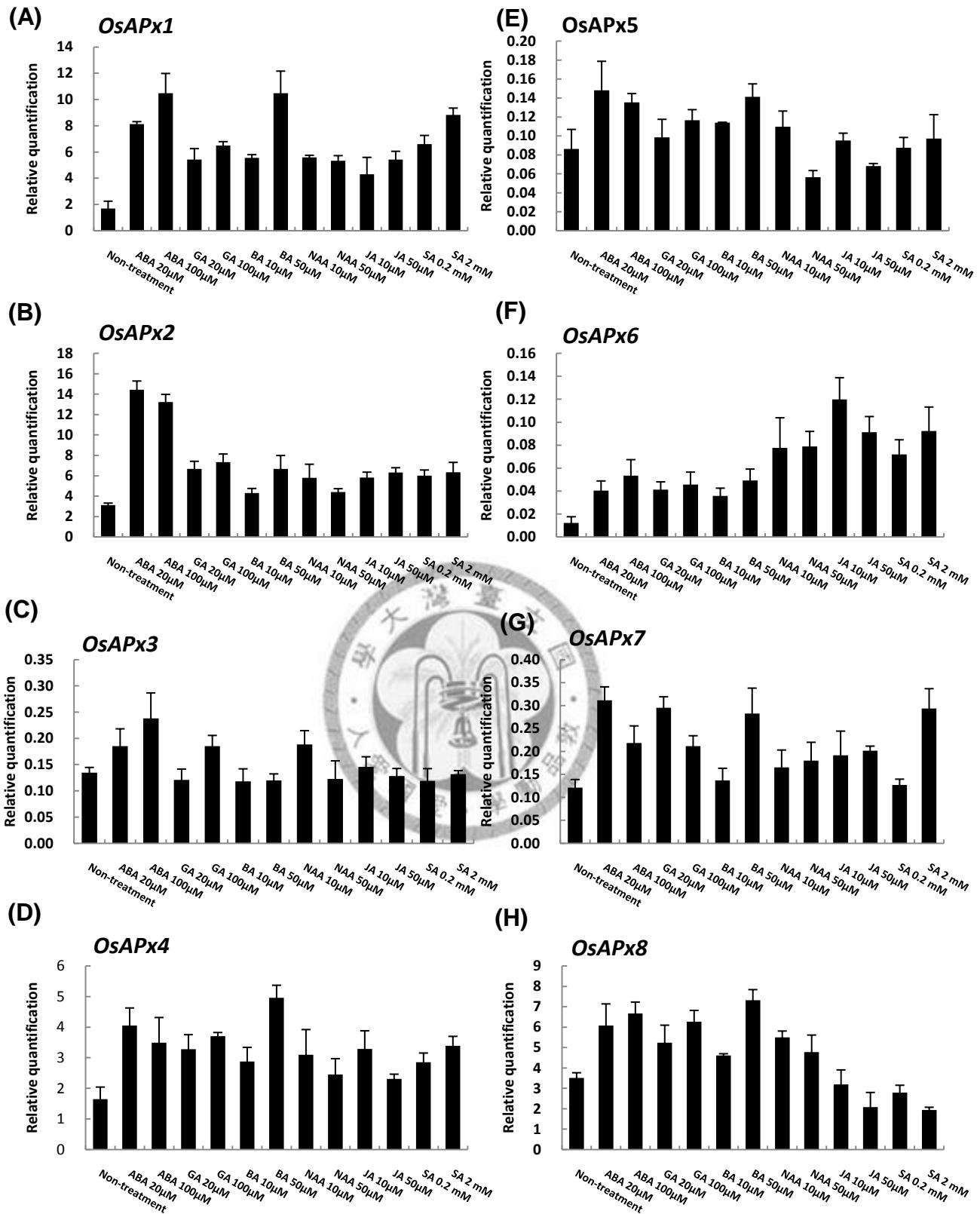


圖11、TNG67水稻地上部在植物荷爾蒙處理下APx家族之基因表現。
水耕栽培兩週大TNG67水稻，分別以20 μ M、100 μ M ABA、20 μ M、100 μ M GA、10 μ M、50 μ M BA、10 μ M、50 μ M NAA、10 μ M、50 μ M JA、0.2 mM、2 mM SA處理6小時後收取地上部材料。樣品收集後萃取RNA並合成第一股cDNA，接著以即時定量聚合酶連鎖反應偵測*OsAPx*基因家族在不同處理下基因表現，並以*OsActin*作為校正用之內部控制組，偵測基因相對表現量，取三次重複平均值作圖，並以standard deviation繪製誤差線。

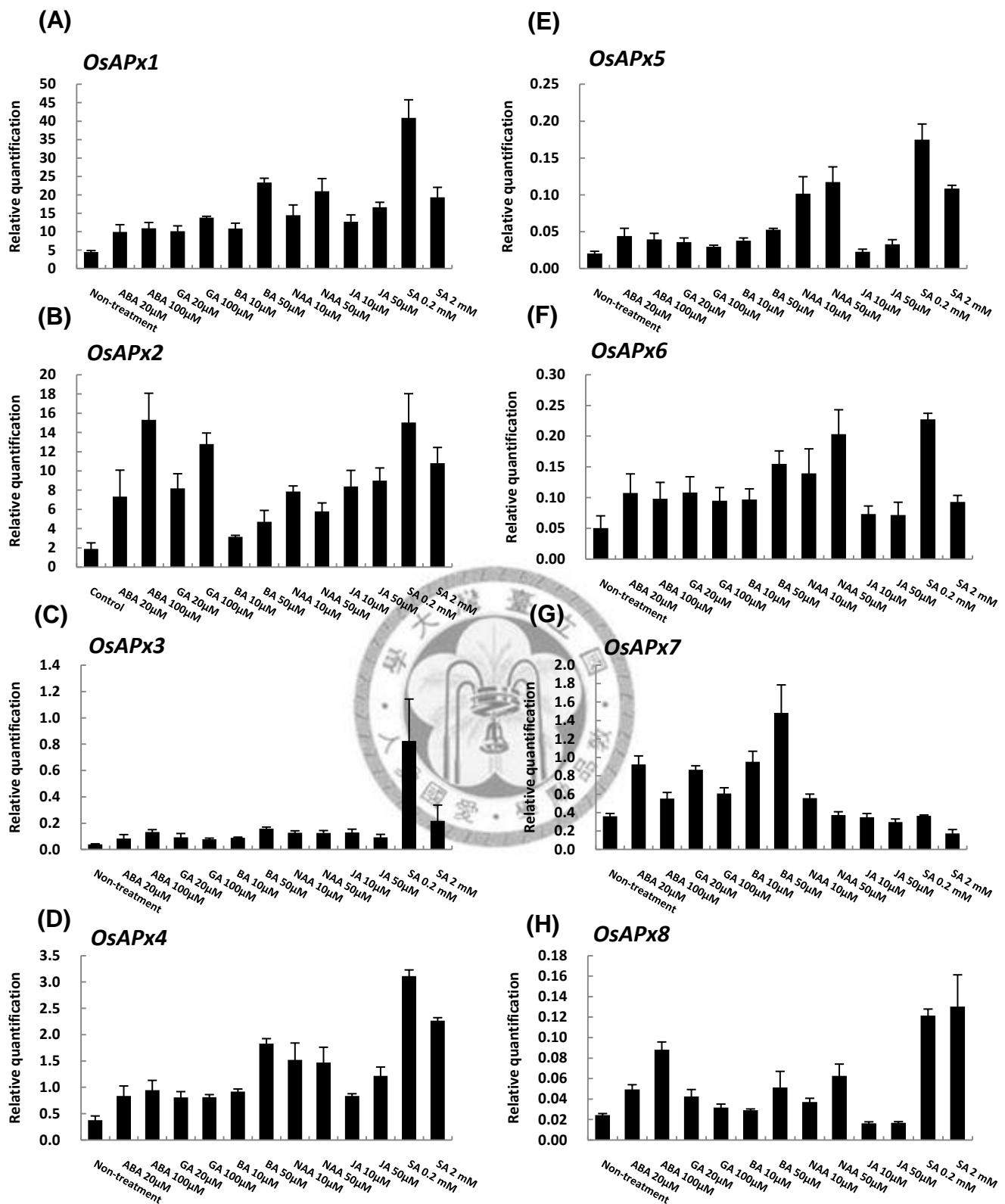


圖12、TNG67水稻根部在植物荷爾蒙處理下APx家族之基因表現。

水耕栽培兩週大TNG67水稻，分別以20 μM、100 μM ABA、20 μM、100 μM GA、10 μM、50 μM BA、10 μM、50 μM NAA、10 μM、50 μM JA、0.2 mM、2 mM SA處理6小時後收取根部材料。樣品收集後萃取RNA並合成第一股cDNA，接著以即時定量聚合酶連鎖反應偵測*OsAPx*基因家族在不同處理下基因表現，並以*OsActin*作為校正用之內部控制組，偵測基因相對表現量，取三次重複平均值作圖，並以standard deviation繪製誤差線。

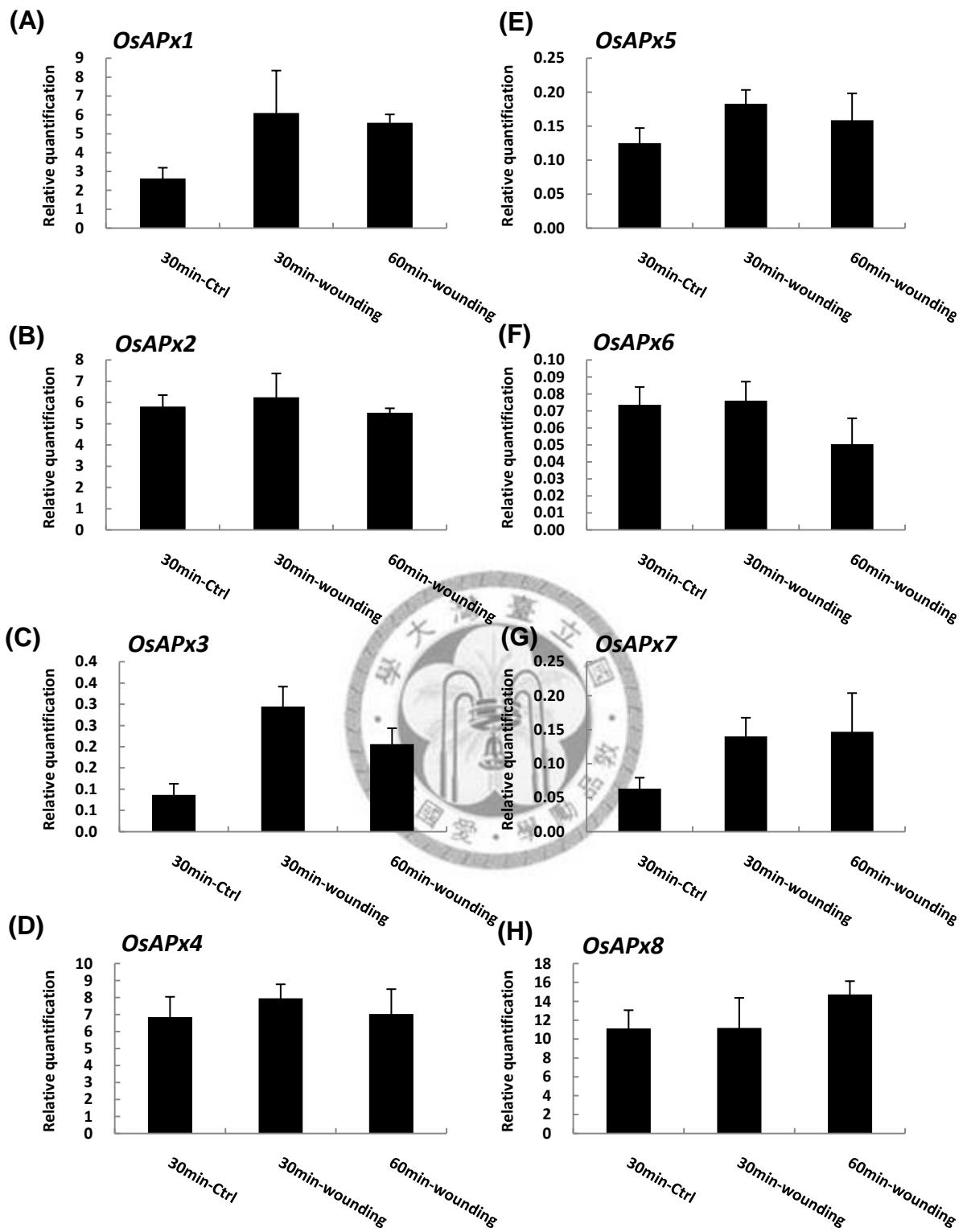


圖13、TNG67水稻葉片刻傷處理後APx家族基因表現。

取兩週大TNG67水稻以刀片製造葉片表面刻傷，置於27 °C 光照下30分鐘及60分鐘，收取植株地上部材料。樣品收集後萃取RNA並合成第一股cDNA，接著以即時定量聚合酶連鎖反應偵測*OsAPx*基因家族在不同處理下基因表現，並以*OsActin*作為校正用之內部控制組，偵測基因相對表現量，取三次重複平均值作圖，並以standard deviation繪製誤差線。

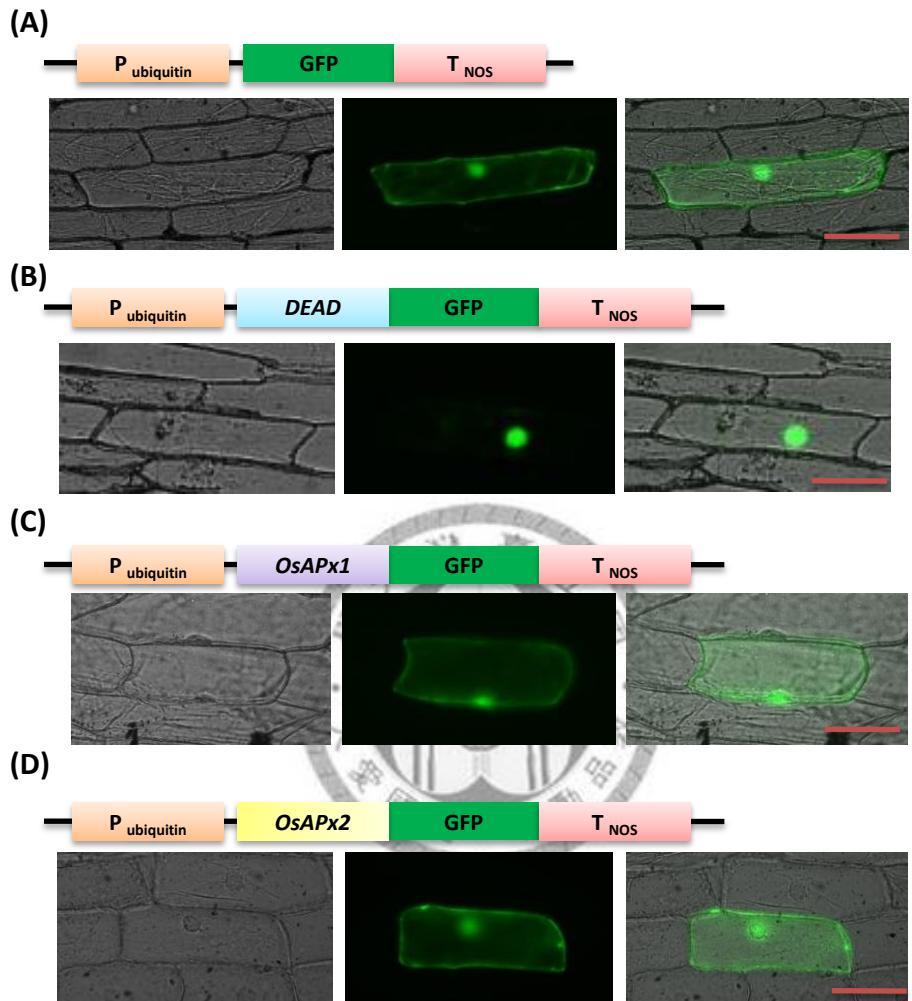
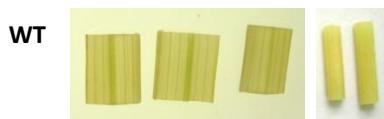


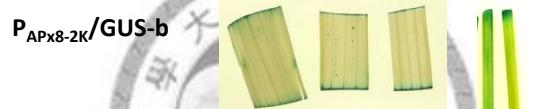
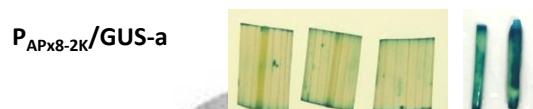
圖14、水稻OsAPx1及OsAPx2次細胞位置分析。

以持續大量表現玉米ubiquitin啟動子驅動(A) GFP、(B) DEAD box、(C) OsAPx1-GFP融合蛋白與(D) OsAPx2-GFP融合蛋白，以基因槍轟擊洋蔥表皮細胞，24小時回復後以螢光顯微鏡觀察GFP表現的位置。以GFP及DEAD box基因作為控制組，GFP在細胞各處皆會表現，DEAD box具有細胞核專一性，bar=100 μm。

(A)



(B)



(C)



圖15、 P_{APx8}/GUS 轉殖水稻組織化學分析。

以帶有OsAPx8上游啟動子序列之載體進行水稻轉殖，(A)為野生型葉片GUS染色；(B) $P_{APx8-2K}/GUS$ 轉殖水稻成熟葉片及葉鞘GUS染色；(C) $P_{APx8-0.8K}/GUS$ 轉殖水稻成熟葉片及葉鞘GUS染色。

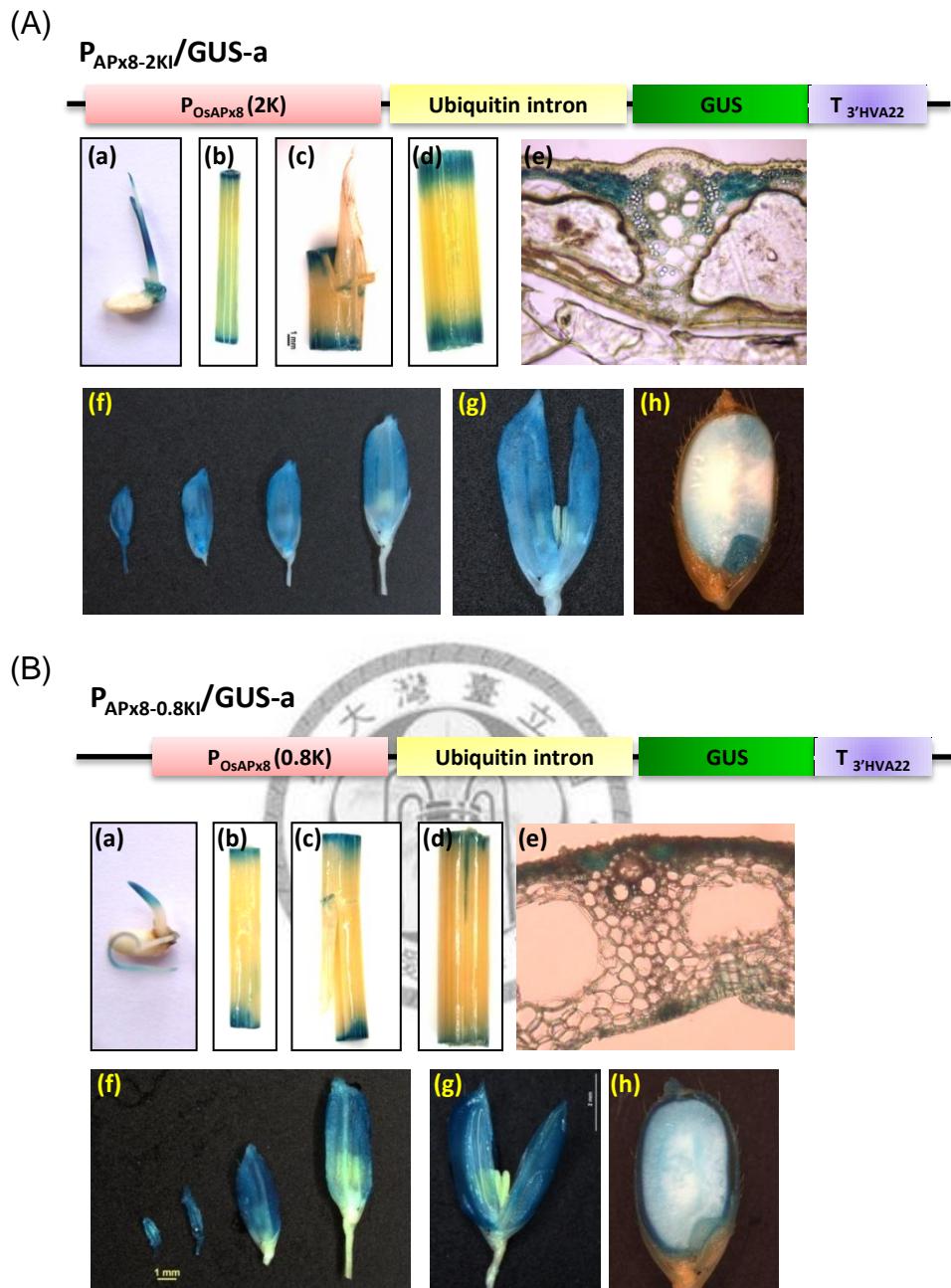


圖16、 P_{APx8}/GUS 轉殖水稻之組織化學分析。

(A) $P_{APx8-2Kl}$ -a之組織染色，(B) $P_{APx8-0.8Kl}$ -a之組織染色，組織標示如下：(a) 兩天大幼苗；(b) 莖；(c) 葉舌及葉耳；(d) 葉鞘；(e) 葉鞘切片；(f) 花序；(g) 花序及花藥；(h) 種子。

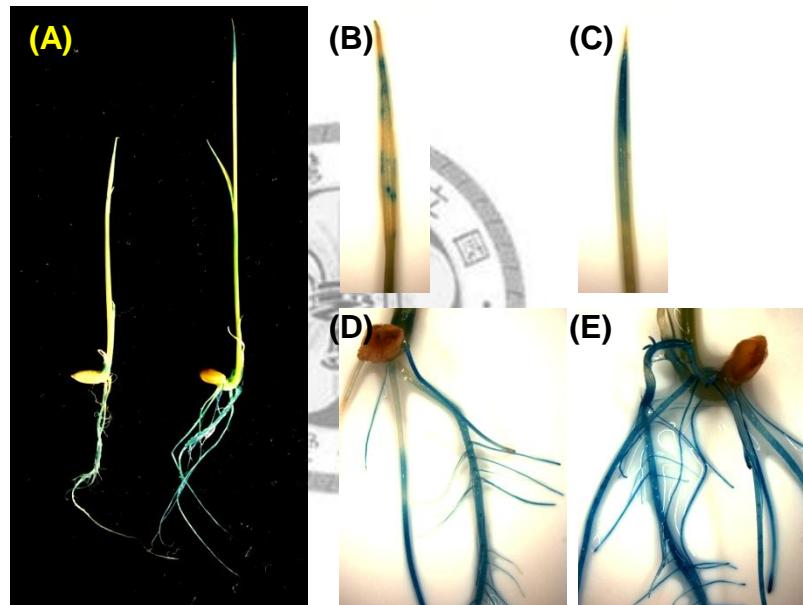


圖17、 P_{osAPx8}/GUS 幼苗鹽份處理下GUS染色

以一周大 $P_{APx8-2K}/GUS$ 幼苗處理200 mM NaCl約12小時後進行GUS染色，真空抽氣處理後染色。(a)植株全圖，左邊為控制組，右邊為經鹽份處理；(b)葉尖；(c)鹽份處理後之葉尖；(d)種子及根部；(e)鹽份處理後之種子及根部。

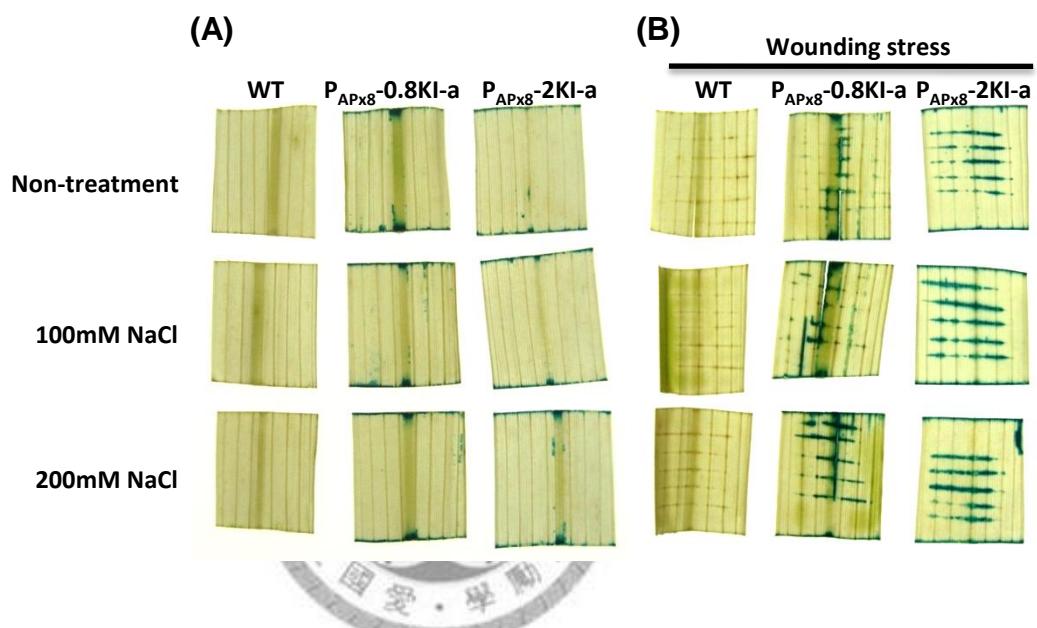


圖18、 P_{APx8} -GUS轉殖水稻在鹽份逆境及刻傷逆境下之組織化學分析。

(A)鹽份逆境係以 P_{APx8} -GUS轉殖水稻在0 mM、100 mM、200 mM NaCl溶液中處理24小時；(B)刻傷係以刀片在葉片上刻劃後置於水面，而雙重逆境係以刻傷後將葉片置於含100 mM、200 mM NaCl之水溶液處理24小時，處理後進行染色約20小時，染色後以70%酒精將葉綠素除去後照相。

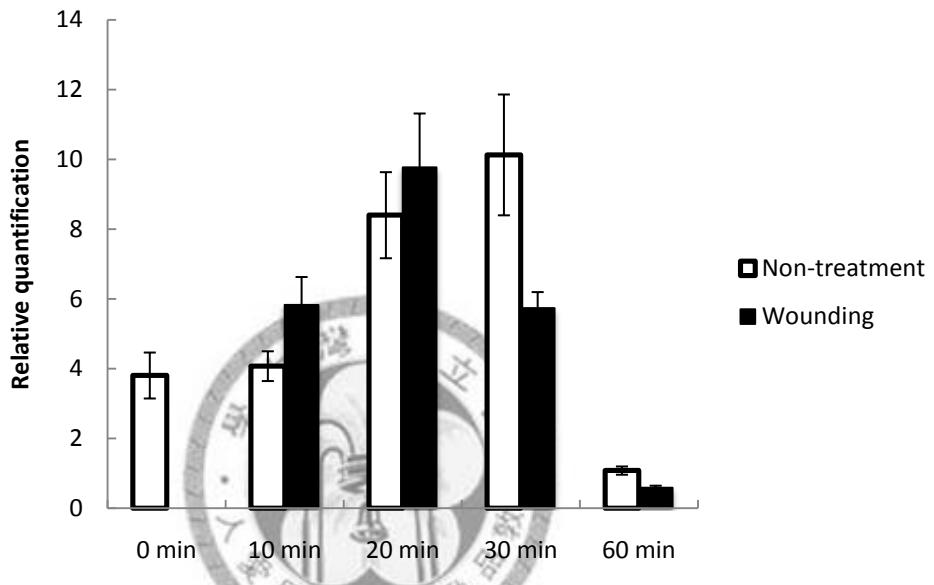
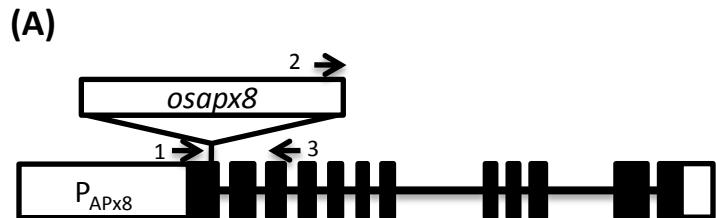
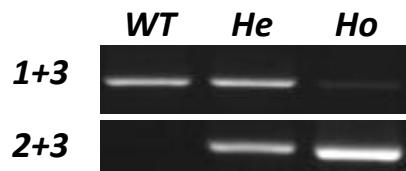


圖19、成熟葉片在短時間刻傷逆境下之OsAPx8基因表現

取在生殖生長期(穀粒充實時期)之TNG67水稻葉片處理短時間物理刻傷逆境，刻傷處理係以約2公分長之水稻切離葉片進行，在葉片表面以刀片刻劃10道刀痕，置於持續光照之水面，待10、20、30、60分鐘後收取材料。樣品收集後萃取RNA並合成第一股cDNA，接著以即時定量聚合酶連鎖反應偵測OsAPx8基因表現，並以OsActin作為校正用之內部控制組，偵測基因相對表現量。



(B) Genotyping



(C) RT-PCR

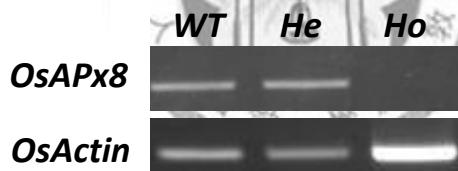
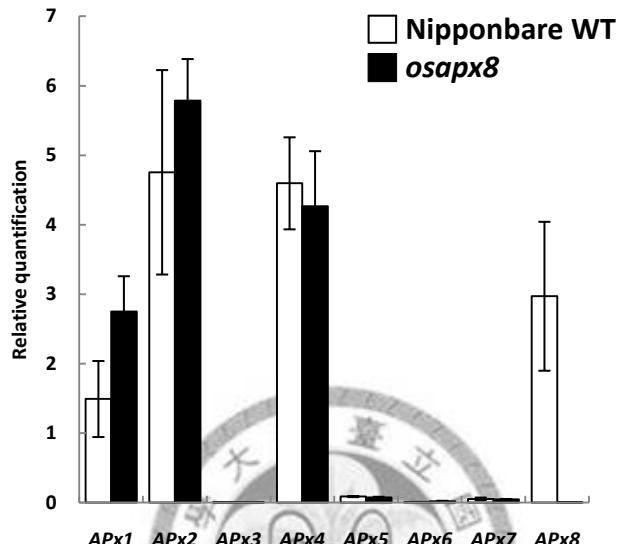


圖20、*ko-osapx8*突變株之分析。

(a) *OsAPx8*之DNA結構分析，以RiceGAAS網站 (<http://ricegaas.dna.affrc.go.jp/>) 預測之外顯子 (exon) 與內含子 (intron) 位置繪置而成，其中 *osapx8*突變株即是插於 *OsAPx8*第一個外顯子；(b) *ko-osapx8*基因型分析，抽取野生型、*ko-osapx8*之染色體DNA，1+3代表內生基因，以位於 *OsAPx8*基因及 *TOS17*上之專一性引子進行PCR反應，2+3代表retrotransposon之插入，5端引子位於retrotransposon上而3端引子則是在內生基因上；(c) *ko-osapx8*之 *OsAPx8*基因表現量分析，抽取樣品RNA並合成第一股cDNA，以 *OsActin*為定量控制組，並以 *OsAPx8*內生基因專一性引子分析 *OsAPx8*基因表現。WT代表日本晴野生型植株，He代表 *ko-osapx8*異型合子，Ho代表 *ko-osapx8*同型合子。

(A)



(B)

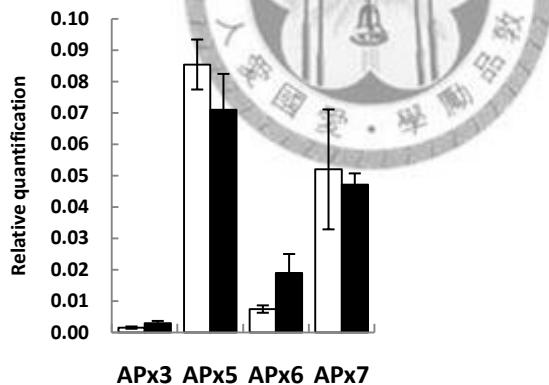


圖21、以即時定量聚合酶方式分析水稻APx8個基因於ko-osapx8中之表現量。

取日本晴野生型、ko-osapx8同型合子萃取RNA並合成第一股cDNA，以即時定量聚合酶反應分析ko-osapx8中，OsAPx基因表現量之改變，以OsAPx基因3'端未轉譯區設計專一性引子進行試驗，取三次重複平均值作圖，並以standard deviation繪製誤差線。

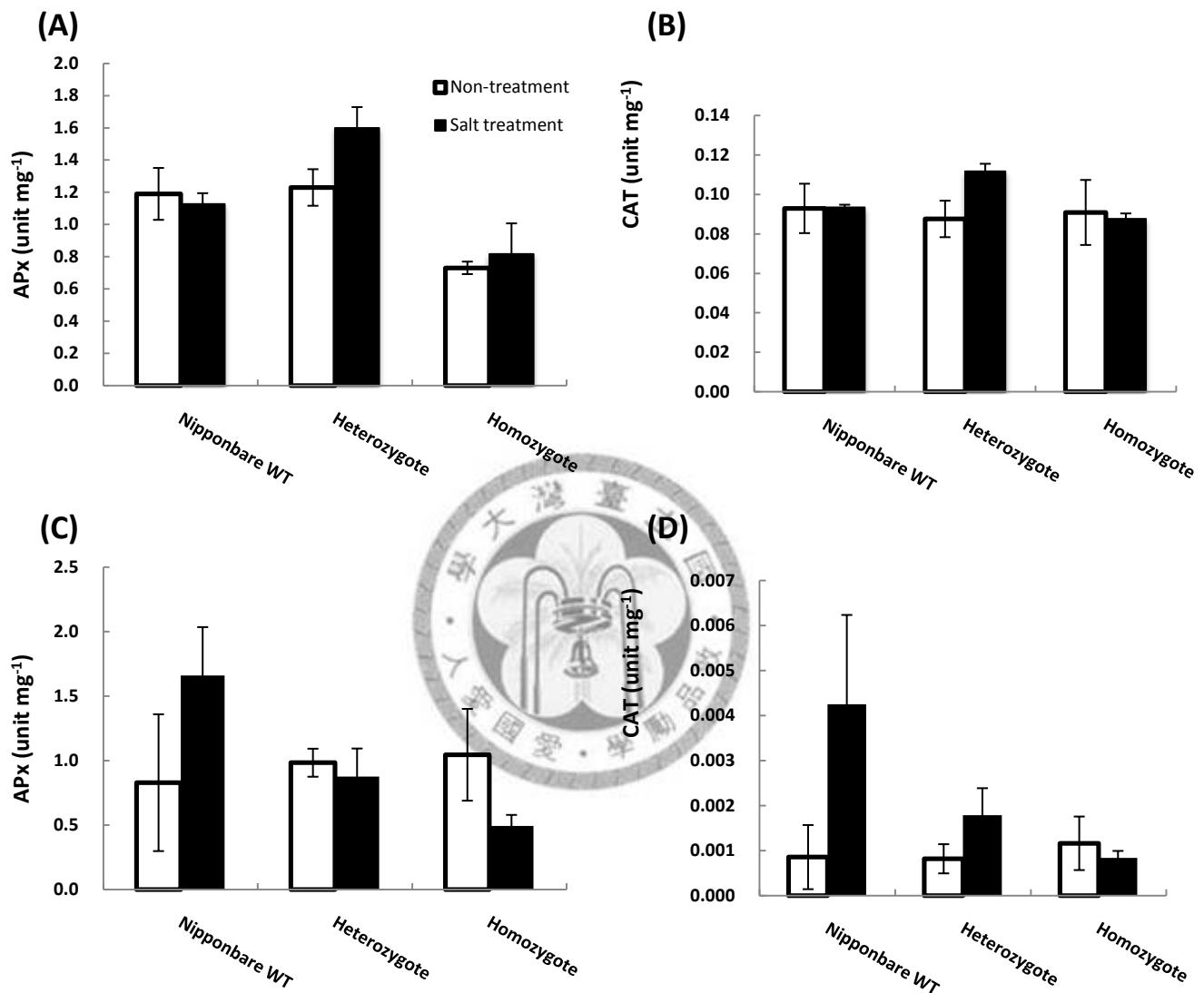


圖22、*ko-osapx8*在鹽份逆境處理下APx及CAT活性測試。

以兩週大日本晴野生型、*ko-osapx8*之異型合子及同型合子進行鹽份逆境處理，在含有200 mM NaCl水耕液處理6小時。(a)地上部APx活性；(b)地上部CAT活性；(c)根部APx活性；(d)根部CAT活性，取三次重複平均值作圖，並以standard deviation繪製誤差線。

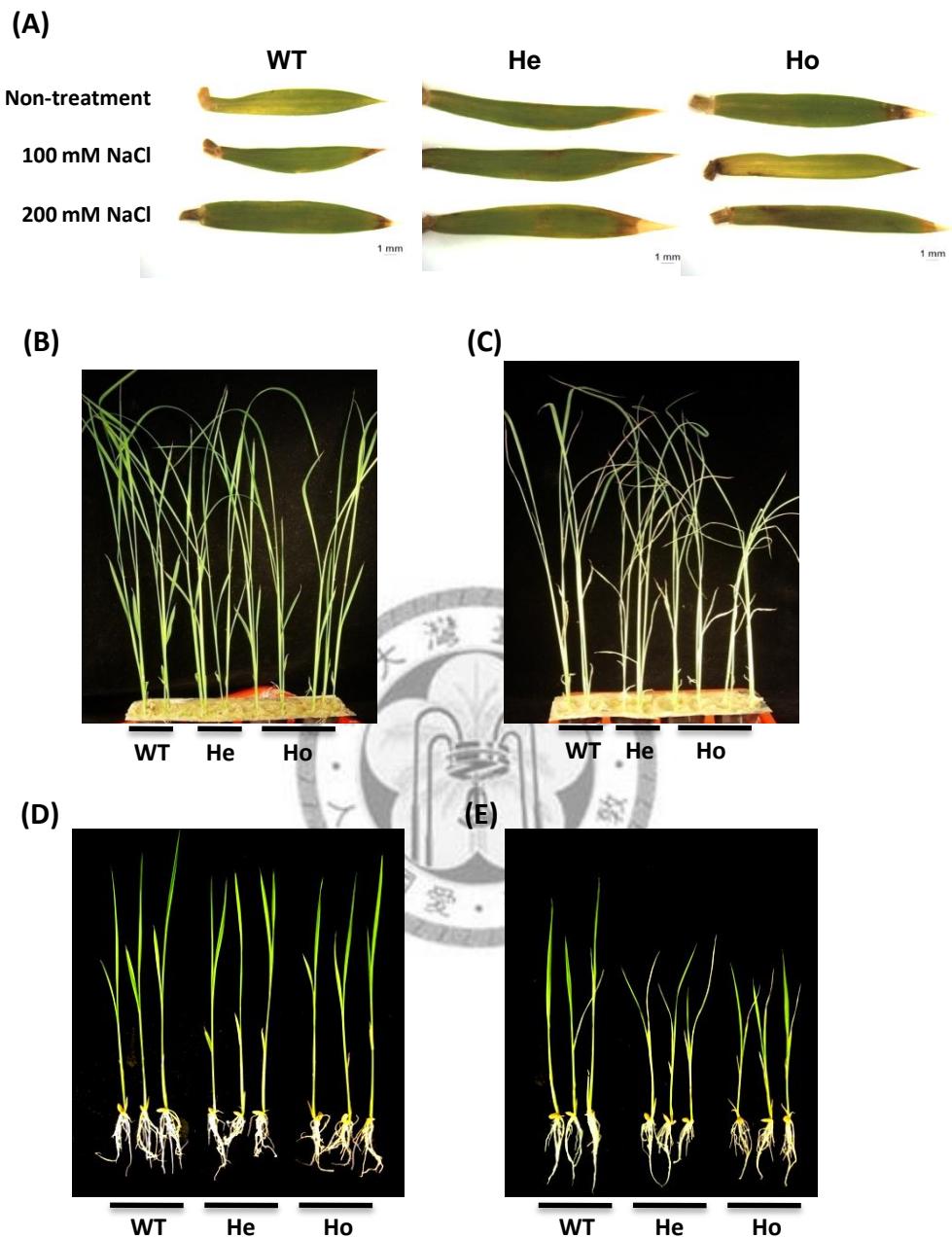


圖23、*ko-osapx8*逆境耐受性測試。

(A)以水耕栽培日本晴野生型、*ko-osapx8*至兩週大，取切離葉片浸泡至100 mM、200 mM NaCl水溶液中，放置於27 °C持續光照室約48小時，觀察葉片外表型變化；(B)(C)日本晴、*ko-osapx8*以栽培土種植水稻至兩週大，外加含有200 mM NaCl之水溶液，處理48小時後移除高鹽水溶液，觀察外表型差異，(B)為未進行鹽分處理，(C)為鹽分處理後之外表型。

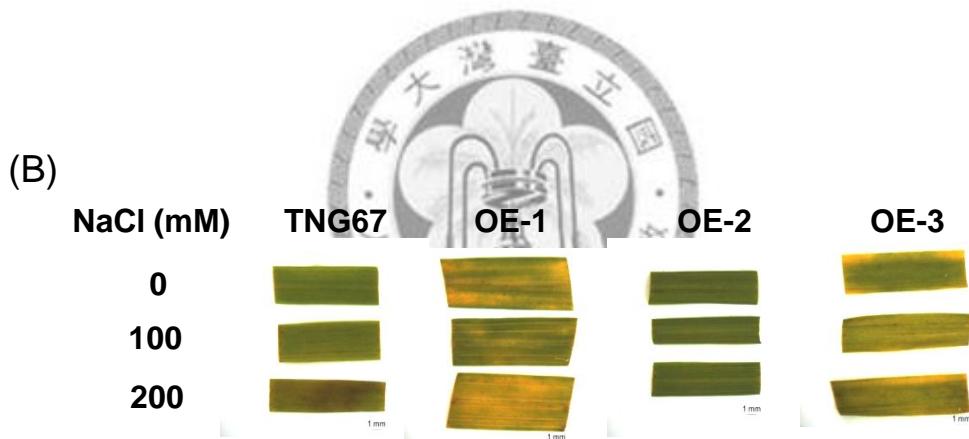
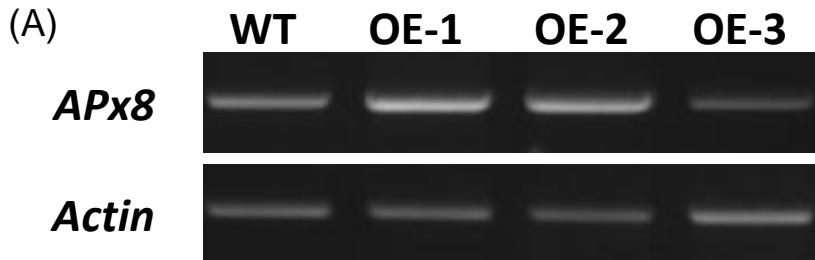
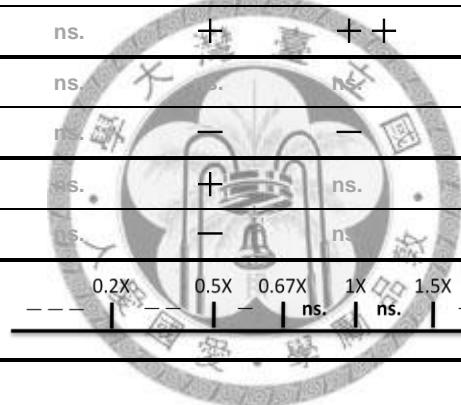


圖24、*oe-osapx8*逆境耐受性測試。

大量表現*OsAPx8*的轉殖水稻。(B)以半定量RT-PCR方式觀察*oe-osapx8*植物中，*OsAPx8*基因表現。以100 mM、200 mM NaCl處理TNG67與*os-osapx8*葉片切片，觀察葉片黃化現象。

表 1、水稻 TNG67 及 TCN1 在重金屬處理下地上部 *APx* 基因表現

重金屬處理 地上部	水稻品種	0.1 mM	0.5 mM	0.1 mM	0.25 mM	1 mM	10 mM
		Cd	Cd	Cu	Cu	Zn	Zn
OsAPx1	TNG67	ns.	+	+	ns.	ns.	+
	TCN1	++	++	++	ns.	ns.	ns.
OsAPx2	TNG67	ns.	+	ns.	ns.	ns.	+
	TCN1	+	ns.	ns.	ns.	ns.	ns.
OsAPx3	TNG67	ns.	ns.	ns.	ns.	ns.	ns.
	TCN1	ns.	ns.	ns.	ns.	—	ns.
OsAPx4	TNG67	ns.	ns.	ns.	ns.	ns.	ns.
	TCN1	ns.	—	ns.	—	—	—
OsAPx5	TNG67	ns.	ns.	ns.	ns.	ns.	+
	TCN1	ns.	—	ns.	—	—	—
OsAPx6	TNG67	ns.	++	++	++	+	++
	TCN1	ns.	+	++	+	ns.	ns.
OsAPx7	TNG67	ns.	—	ns.	ns.	ns.	ns.
	TCN1	ns.	—	—	—	—	—
OsAPx8	TNG67	ns.	+	ns.	—	ns.	+
	TCN1	ns.	—	ns.	—	—	—



基因誘導量標示

0.2X	0.5X	0.67X	1X	1.5X	2X	5X	10X
---	---	---	ns.	ns.	+	++	+++

表 2、TNG67 及 TCN1 在重金屬處理下根部 *APx* 基因表現

重金屬處理	水稻品種	0.1 mM	0.5 mM	0.1 mM	0.25 mM	1 mM	10 mM
根部		Cd	Cd	Cu	Cu	Zn	Zn
OsAPx1	TNG67	++	+++	ns.	+	++	++
	TCN1	++	++	++	++	++	++
OsAPx2	TNG67	++	++	++	+	+	++
	TCN1	++	++	++	++	++	+++
OsAPx3	TNG67	+	++	++	+++	ns.	++
	TCN1	++	++	++	+++	ns.	++
OsAPx4	TNG67	+	ns.	ns.	++	ns.	+
	TCN1	++	++	++	+	ns.	++
OsAPx5	TNG67	ns.	ns.	ns.	ns.	ns.	+
	TCN1	+	+	ns.	—	ns.	ns.
OsAPx6	TNG67	++	++	ns.	+	++	++
	TCN1	++	++	++	+	++	++
OsAPx7	TNG67	++	++	++	++	++	++
	TCN1	++	++	+++	++	++	++
OsAPx8	TNG67	--	ns.	--	—	---	---
	TCN1	+	++	++	++	ns.	++

基因誘導量標示

--- 0.2X 0.5X 0.67X 1X 1.5X 2X 5X 10X
-----|---|---|ns.|ns.|+|++|+++|+++++

表 3、兩週大 TNG67 水稻在非生物性逆境下地上部 *APx* 基因表現

非生物性逆境 地上部	-15% 鮮重	-30% 鮮重	100 mM NaCl	200 mM NaCl	2 μ M ABA	20 μ M ABA
<i>OsAPx1</i>	+	++	+++	++++	++	+++
<i>OsAPx2</i>	ns.	ns.	+++	++++	++	+++
<i>OsAPx3</i>	ns.	+	++	++	++	++
<i>OsAPx4</i>	++	+	++	+++	++	++
<i>OsAPx5</i>	++	++	++	+++	++	+++
<i>OsAPx6</i>	+++	+++	++++	+++++	++++	++++
<i>OsAPx7</i>	+	ns.	+++	++++	+	++
<i>OsAPx8</i>	+	ns.	++	++	+	++

基因誘導量標示

— 0.2X
— 0.5X
— 0.67X
— ns.
— 1X
— ns.
— 1.5X
+ 2X
++ 5X
+++ 10X
++++ 50X
+++++ 100X



表 4、兩週大 TNG67 水稻在非生物性逆境下根部 *APx* 基因表現

非生物性逆境	-15%	-30%	100 mM NaCl	200 mM NaCl	2 μ M ABA	20 μ M ABA
根部 鮮重	鮮重	NaCl	NaCl	ABA	ABA	
<i>OsAPx1</i>	+	+	++	+	++	++
<i>OsAPx2</i>	ns.	ns.	+	ns.	++	++
<i>OsAPx3</i>	+	++	+	+++	++	++
<i>OsAPx4</i>	ns.	+	++	++	++	++
<i>OsAPx5</i>	ns.	+	+	+	++	++
<i>OsAPx6</i>	++	++	++	++	+++	+++
<i>OsAPx7</i>	ns.	ns.	++	++	+	ns.
<i>OsAPx8</i>	++	++	++	++	+	+

基因誘導量標示

—— 0.2X
— 0.5X
— 0.67X
— ns.
— 1X
— ns.
— 1.5X
— +
— 2X
— ++
— 5X
— +++
— 10X
— +++++
— 50X
— ++++++



表 5、兩週大台農 67 號水稻地上部在植物荷爾蒙處以下 APx 家族之基因表現

荷爾蒙處理	ABA (μM)		GA (μM)		BA (μM)		NAA (μM)		JA (μM)		SA (μM)	
地上部	20	100	20	100	10	50	10	50	10	50	200	2000
<i>OsAPx1</i>	++	+++	++	++	++	+++	++	++	++	++	++	+++
<i>OsAPx2</i>	++	++	++	++	ns.	++	+	ns.	+	++	+	++
<i>OsAPx3</i>	ns.	+	ns.	ns.	ns.	ns.	ns.	ns.	ns.	ns.	ns.	ns.
<i>OsAPx4</i>	++	++	++	++	+	++	+	+	++	ns.	+	++
<i>OsAPx5</i>	+	+	ns.	ns.	ns.	+	—	ns.	ns.	ns.	ns.	ns.
<i>OsAPx6</i>	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>OsAPx7</i>	++	+	++	+	ns.	++	ns.	+	+	+	ns.	++
<i>OsAPx8</i>	+	+	+	+	ns.	++	+	ns.	ns.	—	ns.	—
基因誘導量標示	---	0.2X	0.5X	0.67X	1X	1.5X	2X	5X	10X	50X	+++	++++

表 6、兩週大台農 67 號水稻根部在植物荷爾蒙處下 APx 家族之基因表現

荷爾蒙處理 根部	ABA		GA		BA		NAA		JA		SA	
	20	100	20	100	10	50	10	50	10	50	200	2000
OsAPx1	++	++	++	++	++	+++	++	++	++	++	+++	++
OsAPx2	++	+++	++	+++	+	++	++	++	++	++	+++	+++
OsAPx3	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++++	+++
OsAPx4	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+++	+++
OsAPx5	++	++	+	ns.	+	++	+++	+++	ns.	+	+++	+++
OsAPx6	++	++	++	+	+	++	++	++	ns.	ns.	++	+
OsAPx7	++	+	++	+	++	++	+	ns.	ns.	ns.	ns.	--
OsAPx8	++	++	+	ns.	ns.	++	+	++	--	--	+++	+++
基因誘導量標示	---	0.2X	0.5X	0.67X	1X	1.5X	2X	5X	10X	50X	+++	++

表 7、論文使用引子列表

Name of primer	Primer sequences	RE site
qAPx1FW	TAGTCTACTACTGCTAGTAC	
qAPx1RV	TAACAGCCCACCGAGACATT	
qAPx2FW	AGAGTCAGTACGATCAAGAC	
qAPx2RV	TCTTGACAGCAAATAGCTTGG	
qAPx3FW	GCATCGATCACAAATGATCG	
qAPx3RV	CAGCACTCACATATATATACC	
qAPx4FW	TGATGATCCAGCCATACGAACA	
qAPx4RV	TTCAAAGTGCTTTAAATAGTGAAGCT	
qAPx5FW	TCTTGCTACTATAGAGCATATTCTGGTTT	
qAPx5RV	AGATAAGATGGCAAGCAGTAACACA	
qAPx6FW	GCTACTATAGAGCATATTATG	
qAPx6RV	CTAATGGAGAGCACAACTCA	
qAPx7FW	TGAGCCAGATCGCTGAAGTG	
qAPx7RV	TCCAATATGACTCGTGGTCA	
qAPx8FW	TGACCTCCTCTGACGAGTGT	
qAPx8RV	CCATCCTTTACCTCAATTATTACG	
qActinFW	TGGATTGCCAAGGCTGAGTAC	
qActinRV	TCCGAAGAATTAGAAGCATTCT	
gAPx1FW	ACTAGTGCATGGCTAAGAACTAC	Spe I
gAPx1RV	CATATGAGCATCAGCGAACCCCAGTTC	Nde I
gAPx2FW	ACTAGTATGGCAGCAAGTCGTA	Spe I
gAPx2RV	CTCGAGTTCCCTCAGCAAATCCCAGTT	Xho I
gAPx3FW	ACTAGTATGTCGGCGGCCGGTGGTG	Spe I
gAPx3RV	CTCGAGGCCAAGCCTCTTGGATT	Xho I
gAPx4FW	ACTAGTATGCCGCCCGTCGTG	Spe I
gAPx4RV	GGATCCCTGCTCTTAGAAGCC	BamH I
gAPx5FW	ACTAGTATGCCGTGACCGCAT	Spe I
gAPx5RV	CTCGAGTTCAAGTGAATACCC	Xho I
gAPx6FW	ACTAGTATGCCGTGTCACCGCCT	Spe I
gAPx6RV	CTCGAGTTCCAGTGAAATACCCTTG	Xho I
gAPx8FW	ACTAGTAACACTCGACTCGAGC	Spe I
gAPx8RV	CTCGAGGCTCCGAGCAGAGA	Xho I
PAPx8-2KFW	ACTAGTTAGATGGTGGAGCAATGGT	Spe I
PAPx8-0.8KFW	ACCAAATTCTCGTACTAGTCTC	Spe I
PAPx8RV	GTCGACCACTCAAGAACACCTCGA	Sal I

HptFW	CGCGACGTCTGTCGAGAAGTTT
HptRV	ATCGGACGATTGCGTCGCATCGA
OsActin1FW	GAGCATGGTATCGTCAGCAA
OsActin1RV	TCTTCCTTGCTCATCCTGTC
OEAPx8FW	ACTAGTAACACTCGACTCGAGC
OEAPx8RV	ACTAGTGTACATCAGACCATCGTCA
TOSLBFW	ATTGTTAGGTTGCAAGTTAGTTAAGA
mAPx8FW	CAGTGCAATTGTAGGT
mAPx8RV	ACTAGTGTACATCAGACCATCGTCA

