

國立臺灣大學生命科學院植物科學研究所

碩士論文

Institute of Plant Biology  
College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

探討 microRNA 在甘薯傷害的防禦機制

Study of microRNAs involved in wounding response  
in sweet potato



林振祥

Jeng-Shane Lin

指導教授：鄭石通 博士

Advisor: Shih-Tong Jeng, Ph.D.

中華民國 97 年 7 月

July, 2008

## 誌謝

論文寫了一段時間了，現在終於到了致謝。這兩年來的研究生活暫且告一段落，這段日子受到許多人的協助，才能順順利利的完成實驗和論文，要感謝的人太多。首先要先感謝指導教授鄭石通老師認真的指導、常和我討論實驗以及時時鼓勵，讓我學到許多東西，奠定後續研究基礎以及思考問題的能力，也由衷感謝口試委員吳克強老師、邱子珍老師以及鄭秋萍老師不辭辛勞幫我修改論文以及提供論文後續實驗建議，使我的論文更加完善。

想當初大學聯考我的志願卡上滿滿的物理與材料相關的系，而生命科學系卻只填其一，本來想朝物理學或材料學發展，而上天卻帶我進入生物領域，也讓我重拾對生物的熱情。在大學時，受到顏宏真老師的引領進入植物領域，指導我耐鹽性相關基因的研究，以及林正宏老師、映孜學姐、賢書學長、小熊、小羊、詠中及笨笨等人協助與陪伴，學習到很多實驗相關技術，讓我在碩士生涯的開始已經先有研究基礎，能快速的步上軌道。

碩士班有幸進入台大植科所鄭石通老師實驗室，雖然研究的題目在實驗室中無人碰觸過卻也常受到多位學實驗夥伴的幫忙，阿宏哥、小青、鈴蘭、丁丁、幸美、郁蕙、雅玲等學長姐與我討論實驗、指點迷津和指導我實驗技術；同學阿桓、阿吉、詩婕的陪伴與互相砥礪；阿香和孜孝平時的照顧；以及後來加入的芳怡、名淵、昱錡、萬大爺、承翰、宗祺帶來的歡樂與活力能讓我消除壓力。有著實驗室的大家以及台農 57 號的犧牲貢獻，我才能順順利利畢業。

另外要感謝我的朋友們一邊與我吃喝玩樂一邊與我分享實驗或工作生活的點滴及支持我走到最後，有時實驗太晚結束，電話和 MSN 的陪伴成了我的精神食糧支持著我完成實驗。

最後要感謝家人的鼓勵與陪伴，成了我完成碩士學位的支柱。好像漏掉娃娃和安安兩大美女陪我寫論文，雖然你們只會汪汪，但也是陪我身邊看我寫論文。

而旅途的終點卻是另一個的開始，大家加油囉，一起朝著美好的未來前進。

# 目錄

中文摘要	
英文摘要	
第一章	前言
	一、植物的防禦機制..... 1
	二、miRNA 的作用與機制..... 3
	三、實驗方向與目的..... 7
第二章	材料與方法
	一、材料..... 8
	二、實驗材料處理與藥劑..... 8
	三、Total RNA 萃取..... 9
	四、Small RNA 電泳..... 9
	五、北方墨點法分析..... 9
	六、Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)..... 11
	七、質體構築..... 13
	八、Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)..... 14
	九、Small RNA 鈎取..... 15
第三章	結果
	一、miRNA 在甘藷傷害表現之確認..... 18
	二、miR828 訊息傳導..... 19
	三、miR828 標的基因..... 23
	四、甘藷 miRNA 鈎取..... 26
第四章	討論
	一、miR159、miR407、miR828 表現情形..... 27
	二、miR828 的訊息傳遞過程..... 28
	三、miR828 標的基因表現情形..... 32
	四、結論..... 35
圖表	..... 36
參考文獻	..... 54

## 中文摘要

microRNAs (miRNAs)是一段由生物體內自行合成約21-24鹼基的小分子核醣核酸，不轉譯出任何蛋白，其藉由降解mRNA或抑制mRNA進行蛋白質轉譯來達成調控基因表現。近年來在阿拉伯芥上發現超過百種的miRNA，且研究指出miRNA參與植物不同階段的生長發育及抵抗不同環境的變化，所以我們對於與植物傷害相關的miRNA有著極大興趣，希望探討傷害相關miRNA的訊息傳遞的過程。藉由miRNA序列在演化具有高度保留性的特性，利用阿拉伯芥miRNA的序列當作探針探討甘藷植株在遭受傷害後miR159、miR407、miR828的表現情形。在甘藷植株中無偵測到miR407的表現；miR159可在莖中被偵測到，而在葉中表現量極低；miR828則在葉中被偵測到。此外，在甘藷傷害後，miR159表現量並未隨時間不同有所變化，而miR828表現量卻會被抑制。且處理誘導傷害防禦機制相關的分子，如：過氧化氫(hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ )、一氧化氮(nitric oxide, NO)、甲基茉莉酸(Methyl jasmonate, MeJA)、離層酸(abscisic acid, ABA)及乙烯(ethylene)，也會抑制miR828的表現。我們再藉由不同誘導劑與抑制劑探討miR828表現情形進而探討其訊息傳遞的過程，推測植物傷害後，促使NO與MeJA生合成，而MeJA也會而活化NOS產生NO，而NO再活化NADPH oxidase產生 $H_2O_2$ ，或者MeJA本身也會透過過其他分子，而抑制miR828表現進而調控miR828標的基因表現。此外，ethylene也會透過MeJA抑制miR828表現，而一氧化碳(carbon monoxide, CO)會在之中清除 $H_2O_2$ 進而抑制傳遞過程。而miRNA藉由序列互補性辨識標的基因，進而對標的基因進行靜默 (silencing)。我們利用cDNA clone釣取到三個可能的miR828標的基因，分別為*receptor protein kinase (RPK)*、*TLD*和*MYB*。藉由傷害後因miR828表現被抑制而減少對標的基因mRNA降解或降低抑制標的基因蛋白質轉譯，使得標的基因的表現進而參與傷害防禦調控機制。

**關鍵詞:** 甘藷、傷害、microRNA、標的基因、靜默

## Abstract

MicroRNAs (miRNAs) contain approximate 22 nucleotides that post-transcriptionally regulate gene expression by directing mRNA cleavage or translational inhibition. Currently, more than one hundred miRNAs that play multiple roles in growth, development, and stress responses of plants have been identified in *Arabidopsis thaliana*. Here, I investigated the expression patterns of miR159, miR407, and miR828 upon wounding in sweet potato. The expression of miR407 was undetectable in leaves and stems. However, miR159 was expressed in stems and, at low levels, in leaves, whereas miR828 was expressed in leaves and undetectable in stems. Furthermore, the expression of miR828 was decreased upon wounding in sweet potato. Additionally, several defensive responding compounds, including hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), nitric oxide (NO), methyl jasmonate (MeJA), abscisic acid (ABA), and ethylene also suppressed miR828 expression. However, carbon monoxide (CO) suppressed repression of miR828 by wounding. Interactions among these defensive responding compounds for the regulation of miR828 were also studied. Results suggested that wounding stimulates the biosynthesis of MeJA and NO. Then, MeJA activates NO synthase to generate NO. Finally, NO inspires the activity of NADPH oxidase to generate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which suppress miR828 expression. In addition to miR828, three potential miR828 targeted genes, *receptor protein kinase (RPK)*, *TLD*, and *MYB* were isolated and were up-regulated by wounding. In addition, *RPK*, *TLD*, and *MYB* were regulated by NO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> when miR828 was repressed. These results imply that wounding represses the expression of miR828, and consequently regulates the expression of *RPK*, *TLD*, and *MYB* genes to protect plants from damage

**Keywords:** microRNA, miR828, sweet potato, target gene, wounding

# 第一章 前言

## 一、植物的防禦機制

植物因根固著性的關係，造成植物面對外在環境改變而威脅到本身時，無法利用逃離躲避方式來避免傷害。因此植物演化出多種保護措施，藉由釋放訊息傳遞物質或調控逆境或防禦相關基因的轉錄及轉譯，進而啟動防禦措施以抵抗環境所造成的威脅 (Reinbothe et al., 1994; Ryan, 2000; Walling, 2000)。

而在誘導產生防禦機制上，通常是藉由一連串的訊息分子傳遞產生(Ryan, 2000)。這些訊息分子包括了一氧化氮(nitric oxide, NO)、活性氧(reactive oxygen species, ROS)、systemin、植物荷爾蒙，如：離層酸(abscisic acid, ABA)、乙烯(ethylene)、水楊酸(salicylic acid, SA)、茉莉酸(jasmonic acid, JA)...等，以及從受損細胞壁釋放出來的多醣類(polysaccharides)。

NO 為一氣體的小分子物質，有一不成對的電子，有被認為會與 ROS 有進一步反應作用。且 NO 近年來研究指出在植物生長發育上扮演著重要的角色，不但參與種子萌芽、老化等過程，亦具有參與逆境防禦反應的功能。在大豆的抗病機制上，NO 可以快速誘導抗病基因的表現(Delledonne et al., 1998)；在甘藷葉片受到機械性傷害的時候對 NO 進行染色，發現 NO 的產生量會明顯的增加 (Jih et al., 2003)。

ROS 包含了過氧化氫(hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ )和超氧化物(superoxide,  $O_2^-$ )。在植物對抗逆境的反應過程中，ROS 當作一個重要的訊息分子，藉由 ROS 含量的高低而有不同功能與目的。當植物受到傷害或病原菌入侵時，會快速在體內累積 ROS (Apostol et al., 1989)。而在植物的防禦機制， $H_2O_2$  的主要來源是藉由 NADPH-dependent oxidase 系統 (Lamb and Dixon, 1997)。如植物遭受到病原

菌入侵時，會活化 NADPH oxidase 產生  $H_2O_2$ ，並且在病原菌感染處大量累積  $H_2O_2$  進而導致局部細胞死亡，引發 hypersensitive response (HR) 產生病斑(Alvarez et al., 1998)。

Systemin 為 18 個胺基酸組成的胜肽分子，其在植物中主要當作傳遞長距離的訊息分子(Ryan et al., 2000)，和膜上專一受體結合，進而活化防禦基因的表現。在番茄中，systemin 與其膜上專一受體 SR160 結合後會活化 mitogen-activated protein kinase (MAPKs)、JA 合成與防禦基因表現得以達到抗病蟲害(Kandoth et al., 2007)。

且亦有研究在茄科植物活化傷害反應中，systemin 與從受損細胞壁釋放出來的多醣類的作用與植物荷爾蒙 ABA 和 JA 累積而誘導傷害反應相關基因表現相關(Peña-Cortés et al., 1995; Bergey et al., 1996)。ABA 在植物生長發育過程中扮演訊息角色，參與調控種子萌芽、甚至植物發育過程，以及參與多樣逆境反應。在 ABA 缺乏的突變種遭受傷害後無法累積傷害反應誘導基因 proteinase inhibitor II 表現(Peña-Cortés et al., 1996)，因此 ABA 可能為傷害反應中的訊息分子。但在植物傷害後活化 ABA 生合成可能與葉片傷害造成失水現象相關(Reymond et al., 2000)，且傷害活化 ABA 生合成路徑中那一步驟尚不清楚。認為 ABA 亦可能不直接參與活化傷害防禦基因，而只是維持植物的正常生理功能(Birkenmeier and Ryan, 1998)。

而 JA 在植物生長發育與逆境防禦反應扮演調控角色，不但參與種子萌芽、葉片老化(Creelman and Mullet, 1995)、塊莖發育(Kolomiets et al., 2001)...等生長發育相關，而且亦具有參與逆境防禦反應的功能。研究亦指出 JA 在傷害訊息傳導途徑中為二次訊息角色(Schaller, 2001)，傳遞訊息活化下游防禦基因表現。不但能在傷害本片葉誘導防禦機制，且能引起全株植物產生系統性防禦，更能利用揮發性質的甲基茉莉酸(methyl jasmonate, MeJA)散播促使其他植株也能啟動防

禦機制(Schilmiller et al., 2005)。

Ethylene 為氣體荷爾蒙，也參與植物生長發育過程與逆境防禦反應。在傷害訊息傳導中扮演重要的傳遞者，植物遭受傷害時會誘導 ethylene 的生合成(Kende, 1993)，進而參與誘導防禦基因表現。如前人研究報導在番茄遭受傷害時，會誘導 ethylene 的生合成的關鍵酵素 ACC synthase 表現(Olson et al., 1991; Lincoln et al., 1993; Shiu et al., 1998)。

細胞質中游離的Ca<sup>2+</sup>在植物生理反應中扮演重要二次訊息分子，受到外在環境刺激如低溫(Knight et al., 1996)、傷害(Knight et al., 1992)等，會增加細胞內Ca<sup>2+</sup>量，而增加Ca<sup>2+</sup>與攜鈣素結合(Ca<sup>2+</sup>/calmodulin)情形，進而藉由調控多種蛋白質，如: protein kinase、phosphatases，與離子通道觸發下游多樣生理反應(Enslin et al., 1996; Sheen, 1996; Qui et al., 1998; Bergey and Ryan, 1999)。

此外 carbon monoxide (CO)近年來前人研究得知其具有扮演生物訊息傳遞分子之一的功能，其參與種子萌芽與休眠(Dekker and Hargrove, 2002; Liu et al., 2007)、氣孔開閉(Song et al., 2008)相關。Heme oxygenase (HO)被報導可能為植物CO的產生來源(Muramoto et al., 2002)，而且HO亦被報導在大豆植物中參與抗氧化防禦(Noriega et al., 2004)，推測CO可能參與抗氧化防禦。進一步證實CO會參與植物調控鎘逆境(Han et al., 2008)與鹽分逆境(Xie et al., 2008)的反應，減緩氧化逆境的傷害。

## 二、 microRNA (miRNA)的作用與機制

miRNA是一段由生物體內自行合成約21-24鹼基的小分子核糖核酸，不轉譯出任何蛋白，其藉由降解mRNA或抑制mRNA進行蛋白質轉譯來達成調控基因表現。現今研究上，植物miRNA大多為降解mRNA，然miR172則為同時具有兩種調控機制的植物miRNA (Aukerman and Sakai, 2003; Chen, 2004)；而動物miRNA



則多為抑制蛋白質轉譯。

miRNA與siRNA (small interference RNA)的功能相似，作用機制也相似，皆要與靜默複合體結合 (RNA induced silencing complex, RISC) 而執行其降解與其互補相似mRNA的功能，但兩者在生合成機制大不同。植物內生性的siRNA多是由長片段的雙股RNA裂解而成的片段；miRNA是內生性的單股RNA折疊形成特殊的髮夾結構(hairpin)，再經由修飾轉變成成熟的miRNA (mature miRNA) (Sunkar et al., 2007)。

成熟的miRNA生合成是經由miRNA先驅物(primary miRNA, pri-miRNA)修飾而成的，但在動物與植物的miRNA生合成機制亦有不同。動物與植物miRNA皆是經由RNA polymerase II轉錄成miRNA先驅物(Bartel, 2004; Kurihara and Watanabe, 2004; Lee et al., 2004)，這些miRNA先驅物上含一些可以互補的序列而形成特殊的髮夾結構，再藉由一連串酵素修飾作用而生合成。miRNA先驅物經由RNase III enzyme切割成較短的莖-環結構(stem-loop)而形成miRNA前驅物(miRNA precursor, pre-miRNA)，在動物是經由Drosha RNase III endonuclease (Lee et al., 2002; Bartel, 2004)而在植物是Dicer-like 1 (DCL1) (Tang et al., 2003; Kurihara and Watanabe, 2004)進行此過程。此時動物會藉由Exportin 5將miRNA前驅物從核內運送至細胞質中(Yi et al., 2003; Lund et al., 2004; Zeng and Cullen, 2004)，而植物miRNA前驅物依然留在核內。植物和動物的miRNA前驅物分別再藉由DCL1與另一RNase III enzyme Dicer進行切割形成miRNA與互補的另一股(miRNA\*)的複合物(miRNA-miRNA\* duplex) (Bartel, 2004)，而植物的miRNA-miRNA\* duplex另外會再藉由HUA ENHANCER1 (HEN1)在3'端進行甲基化作用(Yu et al., 2005)。此時植物才會藉由HASTY將miRNA-miRNA\* duplex從核內運送至細胞質中(Park et al., 2005)。在細胞質中的miRNA-miRNA\* duplex藉由helicase將雙股分開，miRNA\*被水解而形成成熟的miRNA。mature miRNA

會結合到靜默複合體中而執行其作用(Hammond et al., 2000; Martinez et al., 2002; Schwarz et al., 2002)，調控標的基因的表現(Bartel, 2004)。

miRNA藉由序列互補性辨識標的基因，進而對標的基因進行靜默作用(silencing)。而動物與植物miRNA調控標的基因機制略有不同，動物miRNA與標的基因互補區多處於3' untranslated regions (3' UTR)且多為抑制其蛋白質轉譯；而植物互補區多處於開放閱讀框架(open reading frame, ORF)且多為其降解mRNA(Carrington and Ambros, 2003)。近來研究推測動物與植物調控機制不同可能與序列互補性嚴苛度不同相關，植物miRNA與其標的基因序列互補性高(Rhoades et al., 2002)；動物卻不需像植物的互補性高，只要須與miRNA的5端序列互補性高(Doench and Sharp, 2004)。但Mallory等人於2004年研究報導推測植物某些miRNA調控標的基因亦與動物調控機制相似，對於兩者miRNA功能其5端序列互補性顯得必要。

miRNA在演化上具有相當保留性(conserved)，但植物的保留性卻不及動物的，植物只在成熟的miRNA上而動物卻是在miRNA前趨物上具高度的保留性(Bartel, 2004)。這些保留性高的miRNA家族通常具有多位成員且表現量較非保留性的miRNA來的高。亦有一些保留性的miRNA在不同物種間調控不同標的基因，例如: miR390在阿拉伯芥中調控*trans-acting siRNA 3(TAS3)*基因(Allen et al., 2005)，進而調節*AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF)*家族基因表現量，而蘚苔植物卻沒有*TAS3*基因，蘚苔植物的miR390則為調控*PpTAS4*基因(Talmor-Neiman et al., 2006)，進而調節*APETALA2 (AP2)*-like家族基因表現量。相同的miRNA在不同物種間亦可能扮演不同角色，但也可能在演化上增加其他功能，例如: miR169屬於一保留性miRNA，調控*HAP2*轉錄因子，經由演化後在豆科植物中更增加扮演參與根瘤生成相關的功能(Combier et al., 2006)。

近年來在阿拉伯芥上發現超過百種的miRNA，目前已知大部分miRNA參與

植物不同階段的生長發育，且其標的基因多為轉錄因子。例如：miR159調控*MYB*轉錄因子，參與著種子萌芽(Reyes and Chua, 2007)與開花調控(Tsuji et al., 2006)；miR172調控*AP2*轉錄因子，參與開花調控(Aukerman and Sakai, 2003; Chen, 2004)；miR160 (Mallory et al., 2005)、miR167 (Wu et al., 2006; Yang et al., 2006)調控*ARF*轉錄因子，參與植物荷爾蒙Auxin的調控。除了轉錄因子外，亦有為F-box蛋白質，調控蛋白質的穩定性，如：miR393調控*transport inhibitor response 1 (TIR1)* (Navarro et al., 2006)。

此外，近年研究也指出miRNA對於調控氧化逆境、營養缺乏、疾病...等相當大的貢獻，扮演著調控植物對逆境的適應性。例如：植物處於氧化逆境下，降低miR398的表現量，使得其標的基因*Cu/Zn superoxide dismutases (Cu/Zn SOD)*表現量增加，以對抗氧化逆境(Sunkar et al., 2006)；處於缺磷逆境時，誘導miR399調控植物體內磷酸恆定(Fujii et al., 2005; Chiou et al., 2006)。

亦有報導指出miRNA生合成路徑上重要的酵素DCL1與Argonaute 1 (AGO1)為miR162 (Xie et al., 2003)與miR168 (Vaucheret et al., 2004)的標的基因，說明了miRNA也具有參與調控本身生合成的功能。近年亦發現，miRNA調控*TAS*基因產生大量的siRNA (Allen et al., 2005; Bartel, 2005)，進而調控下游基因。這些都說明著，小小的調控因子miRNA卻對植物生長時期、逆境適應有著大大的影響力。

### 三、 研究目的與方向

由於傷害對於植物來說是嚴重逆境之一，可能會抑制植物生長或者容易遭受病原菌感染進而死亡。所以我們對於與植物傷害相關的miRNA有著極大興趣，希望探討傷害相關miRNA的訊息傳導。

藉由miRNA序列在演化上具有高度保留性，我們於ASPR database (<http://asrp.cgrb.oregonstate.edu/>) 及 miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/>) 挑選可能與傷害防禦調控機制相關的miRNA，分別為miR159、miR407、miR828，並且利用北方墨點法偵測其在植物中表現情形，進而探討其訊息傳導路徑。

除此之外，此miRNA的標的基因研究亦顯得重要，兩者之間的調控扮演著對於調控植物傷害的適應性。於是我們首先利用RACE進行可能的標的基因釣取，並且進行釣取全長，再利用RT-PCR偵測其在植物中表現情形，進而探討miRNA與標的基因之間對於調控植物傷害的適應性的關係。

此外，甘藷本身具有抗病、抗蟲、耐旱等逆境特性，所以我們對於其他更多甘藷miRNA的釣取極感興趣。所以我們採取Lu等人於2007年發於Methods的方法也進行釣取甘藷miRNA。

## 第二章 材料與方法

### 一、 材料與實驗材料處理

本實驗材料為甘藷台農 57 號 (*Ipomoea batatas* cv. Tainung 57)，以組織培養繼代的方式取得幼苗，再將幼苗從培養基中取出種植於根基旺和培養土 (1:2) 的混合土中，於 23°C 的溫室中培養。

### 二、 實驗材料處理及藥劑

#### 2.1 機械性傷害處理與訊息分子之處理

本實驗方式參考於 Farmer and Ryan, 1992。

挑選完全展開的甘藷葉片，由葉柄剪下後浸泡於水中 12 小時，再換水浸泡 12 小時以消除背景值，樣品處理前再次更換水，並以鑷子攝傷葉片為傷害處理，並以只浸泡水的葉片作為未傷害的控制組材料，收取各實驗所需的葉片作為實驗材料，鋁箔紙包裹後並用液態氮急速冷凍，置於-70°C 冰箱保存備用。

#### 2.2 實驗相關藥劑(表二)處理

挑選完全展開的甘藷葉片，由葉柄剪下後浸泡於水中 12 小時，再換水或抑制劑浸泡 12 小時以消除背景值，再更換到含有傷害相關誘導劑或抑制劑的水溶液中，並以只浸泡水的葉片作為控制組材料，在實驗所需的時間到達後，收取各實驗所需的葉片作為實驗材料，鋁箔紙包裹後並用液態氮急速冷凍，置於-70°C 冰箱保存備用。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>供應劑為 50 μM glucose (G) 與 2.5 U/mL glucose oxidase (GO)。NO 供應劑為 0.1 mM sodium nitroprusside (SNP)。Ethylene 供應劑為 1 mM 2-chloroethylphosphonic acid (CEPA)。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>抑制劑為 100 μM diphenylene iodonium (DPI)。NO 抑制劑為 500 μM N<sup>G</sup>-monomethyl L-Arginine monoacetate (NMMA)。Ethylene 抑制劑為 100 μM aminoethoxyvinylglycine (AVG)。JA 抑制劑為 10 mM

diethyldithiocarbamic acid (DIECA)。Ca<sup>2+</sup>螯合劑1 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA)。CO供應劑為Hematin。其他使用相關藥劑濃度: MeJA使用濃度為50 μM，而ABA使用濃度為100 μM。

### 三、 Total RNA 萃取

將植物組織加入液態氮研磨至粉末之後，依照材料與試劑的比例 0.1 g:1 mL 加入 TRIZOL 試劑 (Invitrogen BRL)，混合均勻，室溫靜置 10 分鐘，以 4°C/12000 x g 離心 10 分鐘。取上清液，加入 1/5 體積的 24:1 chloroform:isoamylalcohol，混合均勻後靜置 5 分鐘，以 4°C/12000 x g 離心 15 分鐘。取出上清液加入 1/2 倍體積預冷的 isopropanol，置於冰上 20 分鐘將核酸沈澱。以 4°C/12000 x g 離心 15 分鐘得到沈澱物，將上清液倒除，加入 1 mL 75%酒精將沈澱物震盪懸浮，接著以 4°C/7500 x g 離心 5 分鐘，倒除上清液後以真空抽氣機將剩餘的酒精抽乾，避免影響回溶品質。加入 30 μL DEPC-H<sub>2</sub>O，以 65°C 震盪 20 分鐘回溶，再以 4°C/12000 x g 離心 20 分鐘，取上清液保存於-80°C 冰箱備用。

### 四、 small RNA 電泳

取 20 μg RNA 與 small RNA loading buffer (10 mL deionized formamide, 10 mM EDTA (pH 8.0), 0.025% xylene cyanol, 0.025% bromphenol blue) 混合均勻，以 65°C 加熱 20 分鐘後置於冰上，並且同時將已凝固的 12% denaturing polyacrylamide gel (12% polyacrylamide, 1 X TBE, 8 M urea) 預跑 30 分鐘，再將 RNA 樣本注入膠體，以 1 X TBE buffer 進行電泳分析。電泳結束後，以 0.5 μg/mL ethidium bromide 外染膠體，將膠片置於 UV 燈下確認品質，並拍照存檔。

- 5 X TBE : 0.45 M Tris-base, 0.45 M boric acid, 100 mM EDTA (pH 8.0)

### 五、 北方墨點分析

#### 5.1 RNA 轉印

參考 Alwine 與 Stark (1977) 所發表的方法。取 20 μg RNA 樣品進行電泳分

析。電泳結束後，將膠體置於 UV 燈下確認品質與定量結果，並拍照存檔。跑膠的同時組裝轉漬槽與鹽橋，並裁取適當大小的硝化纖維膜 (nylon membrane, Amersham) 及濾紙片以 20 X SSC (3 M sodium chloride, 0.3 M sodium citrate, pH 7.0) 浸潤 10 分鐘以上。待電泳結束後，將膠體置放於轉漬槽上事先鋪好以 20 X SSC 浸潤之鹽橋上，將 nylon membrane 鋪於含有 RNA 樣品之膠體上。在 nylon membrane 上覆蓋濾紙片，並以保鮮膜封住甲醛瓊脂凝膠之四邊後，覆蓋大量吸水面紙，並在上方置放重物。20 X SSC 將由下方轉漬槽中往上被吸水面紙所吸收，RNA 樣品伴隨 20 X SSC 之流動方向結合至 nylon membrane 上。轉漬 16 小時以後將 nylon membrane 自轉漬槽上取下，置放於 37°C 低溫烘乾後，進行 30 秒 UV-light cross-link。

## 5.2 雜合反應與訊號分析

將含有 RNA 樣品之 nylon membrane 置於 50 °C 預熱的雜合緩衝液 (( hybridization buffer : 6 X SSC (0.9M sodium chloride, 0.09 M sodium citrate), 0.5% SDS, 5 X Denhard's solution (0.1% Ficoll, 0.1% bovine serum albumin, and 0.1% polyvinyl pyrrolidone) ) 中，於雜合管內以最低轉速進行預雜合反應兩小時，同時以體外轉錄 (*in vitro* transcription) 反應製作 [  $\alpha$  ] P<sup>32</sup>-ATP 放射性標定核酸探針。反應完成後，將探針加入雜合管中置於 50 °C 進行雜合反應 8 小時以上。雜合反應完成後，以 20 mL primary stringency buffer ( 1 X SSC, 0.1 % SDS ) 於 55 °C 中以最高轉速搖洗 15 分鐘兩次，接著以 20 mL secondary stringency buffer ( 0.2 X SSC, 0.1 % SDS ) 於 55 °C 中最高轉速搖洗 15 分鐘一次。取出 nylon membrane 烘乾，置於磷光感應版中壓片，壓片結束後並於 Phosphoimage (Molecular Dynamics) 偵測訊號。

## 5.3 探針製備

藉由體外轉錄製備探針，依照下列反應表加入微量離心管中：

Reagent	Volume
Transcription Optimized 5 X Buffer	4 $\mu$ L

DTT (100 mM)	2 $\mu$ L
rCTP, rGTP and rUTP Mix (2.5 mM)	4 $\mu$ L
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P] rATP (50 $\mu$ Ci at 10 mCi/ml)	5 $\mu$ L
DNA template, linearized (in water or TE buffer at 0.2–1.0 $\mu$ g/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor (Promega)	20 units
T3 RNA Polymerase (Promega)	20 units
Total volume	20 $\mu$ L

- DNA template：為表一中，T3 top strand + T3 anti miRNA

混合均勻後，靜置於 37°C 下作用 1 小時。在體外轉錄完成後，再加入 RQ1 RNase-Free DNase (Promega) 去除 DNA template，混合均勻後，靜置於 37°C 下作用 30 分鐘。

## 六、 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

### 6.1 First-Strand cDNA Synthesis：(使用 CLONTECH 公司所出品的 SMART RACE cDNA Amplification Kit)

取 3  $\mu$ g 的 total RNA 置於 0.5 mL 的微量離心管中，依下表配置：

5'-RACE-Ready cDNA		3'-RACE-Ready cDNA	
Total RNA	3 $\mu$ L	Total RNA	4 $\mu$ L
5' CDS primer	1 $\mu$ L	3' CDS primer	1 $\mu$ L
BD SMART II A oligo	1 $\mu$ L		
Total volume	5 $\mu$ L	Total volume	5 $\mu$ L

混合均勻後將離心管置於 70°C 作用 10 分鐘，再置於冰上 2 分鐘。稍微離心一下後再分別依下表加入：



Reagent	Volume
5 X First-Strand buffer	2 $\mu$ L
DTT (20 mM)	1 $\mu$ L
dNTP Mix (10 mM)	1 $\mu$ L
BD PowerScript Reverse Transcriptase	1 $\mu$ L
Total volume	10 $\mu$ L

混合均勻後置於 42°C 反應 1.5 小時。反應完畢後，以 100  $\mu$ L 滅過菌的二次蒸餾水稀釋產物，再置於 72°C 作用 7 分鐘。

## 6.2 RACE PCR 反應：(使用 CLONTECH 公司所出品的 Advantage 2 PCR Kit)

依下表配製配置反應溶液，混合均勻後進行 PCR 反應：

Reagent	Volume
PCR-Grade Water	17.25 $\mu$ L
10 X BD Advantage 2 PCR Buffer	2.5 $\mu$ L
10 mM dNTP Mix	0.5 $\mu$ L
50 X BD Advantage 2 Polymerase Mix	0.5 $\mu$ L
5' (or 3') -RACE-Ready cDNA	1.25 $\mu$ L
10 X UPM (Universal Primer Mix)	2.5 $\mu$ L
10 $\mu$ M GSP (Gene Specific Primer)	0.5 $\mu$ L
Total	25 $\mu$ L

PCR 反應條件：95°C/5 分鐘，(95°C/45 秒，55-68°C/45 秒，72°C/120 秒，共 35 個循環)，72°C/15 分鐘，4°C 結束。將全部的 PCR 產物進行電泳分析，確定有 PCR 增殖條帶且正確無誤，將之從瓊脂凝膠上切下並萃取出來進行定序。

## 七、 質體構築

### 7.1 DNA 黏合反應

使用益生生技開發公司所出品之 yT&A Cloning kit，依照下列反應表加入微量離心管中：

Reagent	Volume
Ligation buffer A	1.0 $\mu$ L
Ligation buffer B	1.0 $\mu$ L
yT&A vector	2.0 $\mu$ L
PCR product	2.0 $\mu$ L
T4 DNA ligase	1.0 $\mu$ L
二次蒸餾水	4.0 $\mu$ L
Total volume	10.0 $\mu$ L

混合均勻後，靜置於室溫作用 30 分鐘。

### 7.2 轉形作用

本實驗使用益生生技開發公司所出品之益生 ECOS 101 之 1 分鐘勝任細胞。首先將冷凍的益生勝任細胞取出，放置冰上解凍後，取 20  $\mu$ L 勝任細胞並加入 5  $\mu$ L 的 ligation mixture，混合均勻後，以 42°C 45 秒進行大腸桿菌轉行作用。再塗佈於選擇性培養基上，以 37°C 培養 18 小時。

### 7.3 質體 DNA 的抽取與挑選

以 PRO TECH 公司的產品 Gene-Spin™ MiniPrep Purification Kit-V<sup>2</sup> 進行小量質體之抽取。挑取單一菌落培養在含有抗生素的 LB 培養液中，以 37°C 震盪培養 16 到 18 個小時之後，取 3 mL 菌液離心 2 分鐘 (8000  $\times$  g) 後倒掉上清液。首先加入 200  $\mu$ L solution I 以劇烈震盪均勻懸浮菌塊，然後加入 200  $\mu$ L solution II，以上下緩慢倒置均勻混合溶液，將細胞打破後，再加入 300  $\mu$ L solution III 進行中和，

均勻混合後於4°C/12000 × g離心15分鐘。緩緩取出上清液，避免吸取白色沈澱物，並將上清液加入特殊離心管上層，接著以13000 × g離心30秒，會使得溶液經過中間管柱流到下層，而將DNA留在管柱中，之後將下層溶液倒掉，加入600 μL washing solution再如上述離心後倒出wash buffer，再以12000 × g離心5分鐘，抽乾washing solution，加入50 μL 二次水至濾膜上，於65°C 震盪回溶質體DNA，經過離心後所得溶液則含有所欲分離之質體DNA，同樣可用於進行大部分酵素反應。

使用yT&A vector(MDBio Inc, Taipei, Taiwan)上原有的序列作為引子(M13F和M13R primer)，進行PCR增殖反應，經瓊脂凝膠電泳分析結果，確認所挑選之菌落帶有的質體是否有目標DNA的插入。

## 八、 RT-PCR

### 8.1 反轉錄反應Reverse transcription (RT)

取1 μg RNA加入1 μg oligo (dT) T25VN 引子後，補DEPC-H<sub>2</sub>O至總體積10 μL，70°C 10分鐘，置於冰上2分鐘後，再加入最後濃度為1 mM的dNTP、1倍MMLV buffer及200 U M-MLV reverse transcriptase (Promaga)，補DEPC-H<sub>2</sub>O至總體積為30 μL，於42°C 90分鐘進行反應，最後以72°C 10分鐘終止反應，所得cDNA保存於-20°C 備用 (Sambrook et al., 1989)。

### 8.2 PCR反應 (polymerase chain reaction)

依下表配製配置反應溶液，混合均勻後進行 PCR 反應：

Reagent	Volume
cDNA	3 μL
10 X PCR Buffer	2 μL
2.5 mM dNTP Mix	2 μL
DNA Taq polymerase	0.5 μL
10μM GSP1	0.5 μL

10 $\mu$ M GSP2	0.5 $\mu$ L
Total	20 $\mu$ L

以95°C 10分鐘，然後 95°C 20秒，(primer Tm) °C 20秒，72°C X秒（視片段長短而定），25~30個循環；最後 72°C 10分鐘終止酵素反應。

## 九、 Small RNA調取

本實驗參考於Lu et al., 2007

### 9.1 小分子 RNA 分離 (Low molecular weight RNA isolation, RNA species $\leq$ 200 nt)

利用 TRIZOL 試劑 (invitrogen BRL) 進行抽取植物 total RNA 後，加入 50% PEG (MW = 8000) 與 5 M NaCl 至最後濃度為 5% PEG 與 0.5 M NaCl，混合均勻後，再放置於冰上 30 分鐘，以 4°C/12000  $\times$  g 離心 10 分鐘，沉澱物為大分子 RNA 而上清液含小分子 RNA，我們收取上清液，加入 3 倍體積 100%酒精與 0.1 倍體積 3 M NaOAc，再放置於-20°C 冰箱至少 2 小時，以 4°C 最高速離心 30 分鐘，將上清液倒除，加入 1 mL 75%酒精將沈澱物震盪懸浮，接著以 4°C/7500 x g 離心 5 分鐘，倒除上清液後以真空抽氣機將剩餘的酒精抽乾，避免影響回溶品質。加入 10  $\mu$ L DEPC-H<sub>2</sub>O 回溶。

### 9.2 純化 17-27 nts 小分子 RNA

取分離出的小分子 RNA 以 15% denaturing polyacrylamide gel (15% polyacrylamide, 1 X TBE, 8 M urea)進行電泳，再將 17-27 nts 片段 small RNA 回收。將回收的膠體放入 250  $\mu$ L 0.3 M NaC 中，放置室溫至少 4 小時，再將膠體與液體分離，收取液體加入 2.5 倍體積 100%酒精與 3  $\mu$ L glycogen，再放置於-80°C 冰箱至少 2 小時，以 4°C 最高速離心 30 分鐘，將上清液倒除，加入 1 mL 75%酒精將沈澱物震盪懸浮，接著以 4°C/7500 x g 離心 5 分鐘，倒除上清液後以真空抽氣機將剩餘的酒精抽乾，避免影響回溶品質。加入 10  $\mu$ L DEPC-H<sub>2</sub>O 回溶。

### 9.3 5' 端接合子連接與純化 (5' Adaptor ligation and purification)

依下表配製配置反應溶液，混合均勻後進行接合反應：

Reagent	Volume
purified small RNAs	5 $\mu$ L
20 $\mu$ M 5' RNA adaptor	2 $\mu$ L
10 X RNA ligase buffer	1 $\mu$ L
T4 RNA ligase	2 $\mu$ L
Total	10 $\mu$ L

靜置於 10 $^{\circ}$ C 作用一天。再以 10% denaturing polyacrylamide gel (10% polyacrylamide, 1 X TBE, 8 M urea) 進行電泳，再將 50-65 nts 的片段 small RNA 進行回收，後續同方法 9.2。

### 9.4 3' 端接合子連接與純化 (3' Adaptor ligation and purification)

依下表配製配置反應溶液，混合均勻後進行接合反應：

Reagent	Volume
purified small RNAs	5 $\mu$ L
20 $\mu$ M phosphorylation of of 3' DNA adaptor	2 $\mu$ L
10 X RNA ligase buffer	1 $\mu$ L
T4 RNA ligase	2 $\mu$ L
Total	10 $\mu$ L

靜置於 10 $^{\circ}$ C 作用一天。再以 7.5% denaturing polyacrylamide gel (7.5% polyacrylamide, 1 X TBE, 8 M urea) 進行電泳，再將 70-85 nts 的片段 small RNA 進行回收，後續同方法 9.2。

## 9.5 RT-PCR

同方法八，但反轉錄時使用 3' adaptor primer，非用 T25VN 引子。待 PCR 反應結束，再進行 5% polyacrylamide gel (5% polyacrylamide, 1 X TBE) 電泳，再將 70-85 nts 的片段進行回收，後續同方法 9.2。並將之使用益生生技開發公司所出品之 yT&A Cloning kit 進行載體構築(同方法 7)。



### 第三章 結果

#### 一、 miRNA 在甘藷傷害表現之確認

現今並未有甘藷 miRNA 的鈎取與研究，為了甘藷在傷害下參與調控防禦相關基因表現之 miRNA 研究，所以我們利用 miRNA 序列具有高度的保留性的特性於 ASPR database 及 miRBase 挑選可能與傷害防禦調控機制相關的 miRNA，分別為 miR159、miR407 和 miR828，並且利用北方墨點法偵測其在甘藷中表現情形。在前人研究中，阿拉伯芥種子萌芽時 miR159 受到離層酸調控(Reyes et al., 2007)；miR407 被預測調控 *ACC oxidase (At1g12010)* 和 *lectin (At5g49870)* (Sunkar and Zhu, 2004)；miR828 被預測調控受茉莉酸誘導的 *MYB113* 和 *TAS4* (Rajagopalan et al., 2006)。由於離層酸、乙烯和茉莉酸都是植物遭受傷害時所參與防禦機制的植物荷爾蒙，而 miR159、miR407 和 miR828 分別與這些荷爾蒙相關。故我們探討 miR159、miR407 和 miR828 是否參與傷害反應。

由於 miR159、miR407 和 miR828 可能與傷害防禦調控機制相關，我們利用北方墨點法偵測這三個 miRNA 在甘藷植株遭受機械性傷害後表現情形(圖一)。分別收取甘藷受傷害後不同時間點的莖和葉，進行北方墨點法分析。由實驗結果得知，無論在甘藷莖或葉中都無偵測到 miR407 的表現。miR159 可在莖中被偵測到，而在葉中卻無偵測到，在後續進一步分析可知 miR159 在葉中表現量極低；miR828 則反之，可在葉中被偵測到。此外，在甘藷傷害後，miR159 表現量並未隨時間不同有所變化，而 miR828 表現量卻隨傷害後時間不同有不一樣量的改變。藉此推測 miR828 可能參與傷害反應。

進一步確認分析 miR828 在甘藷葉片傷害後表現情形，分別收取葉片傷害後 0.5、1、3 和 6 小時，進行北方墨點法分析(圖二)。由實驗結果得知，miR828 在傷害後 1 小時表現量開始降低，而 3 小時表現量降到最低值。推知 miR828 在甘

諸傷害後表現量被抑制。

## 二、 miR828 的訊息傳遞過程

### 2.1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、NO 與 miR828 表現之關係

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 與 NO 為生物體中一個重要分子，其功能不僅在植物對抗逆境的反應過程中當作一個重要的訊息分子，而且植物在遭受到機械性傷害的時候，也會產生大量的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 與 NO 來進行反應 (Jih *et al.*, 2003)。

因此，我們探討 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 與 NO 是否造成 miR828 表現量改變。收取經由 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 供應劑 Glucose/Glucose oxidase 與 NO 供應劑 SNP 處理 6 小時的甘藷葉片，進行北方墨點法分析，以僅處理水的葉片當作控制組(圖三)。由實驗結果得知，外加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 與 NO 也會造成 miR828 表現量降低的情形。

為了想進一步了解是否植物遭受機械性傷害後，藉由產生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 與 NO 進而調控 miR828 的表現量。前人研究指出訊息傳遞中產生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的主要來源是 NADPH oxidase (Lamb and Dixon, 1997)，而傷害後產生的 NO 可能是經由 NOS 酵素的活化而產生 (Jih *et al.*, 2003)，所以我們藉由事先處理 NADPH oxidase 抑制劑 DPI 與 NOS 抑制劑 NMMA 來分析傷害後 miR828 表現量。

我們事先利用 DPI 與 NMMA 處理葉片 12 小時，再利用鑷子進行機械性傷害，並在 3 小時後收取葉片進行北方墨點分析(圖四)，以僅處理 DPI 與 NMMA 的葉片當作控制組。由結果得知，DPI 與 NMMA 會影響傷害後 miR828 的表現量。在僅處理傷害，miR828 的表現量為未傷害的 0.5 倍，而在處理 DPI 與 NMMA 後 miR828 的表現量則分別為未傷害的 0.76 與 0.85 倍，減少被抑制的情形。

綜合以上結果，植物遭受機械性傷害後，可能藉由 NADPH oxidase 產生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 與 NOS 產生 NO 進而調控 miR828 的表現量。



前人亦報導 NO 會影響  $H_2O_2$  的產生與功能(Wendehenne et al., 2004), 所以我們對於  $H_2O_2$  與 NO 兩者之間如何調控 miR828 亦感興趣。我們藉由 NADPH oxidase 抑制劑 DPI 的前處理, 再處理 NO 供應劑 SNP, 並且收取葉片進行北方墨點分析(圖五), 以僅處理 DPI 的葉片當作控制組。由結果得知, DPI 不會影響到 Glucose/Glucose oxidase 處理後的 miR828 表現量, 但會影響 SNP 處理後 miR828 的表現量。在 DPI 存在時與僅處理 SNP 比較, miR828 表現量有減少被抑制的情形。

綜合以上結果, 植物遭受機械性傷害後, 可能藉由 NOS 產生 NO 進而活化 NADPH oxidase 產生  $H_2O_2$  進而影響 miR828 的表現量。

## 2.2 植物荷爾蒙與 miR828 表現之關係

植物遭受傷害時, 亦透過產生荷爾蒙傳遞傷害訊息調控下游基因表現, 其包含 ABA、JA 與 ethylene。我們也探討這三種荷爾蒙與 miR828 之間的關係。

我們收取經由 ABA 處理 6 小時的甘藷葉片, 進行北方墨點法分析(圖三), 以僅處理水的當作控制組。由結果得知, ABA 僅些微影響 miR828 的表現量, 為控制組的 0.8 倍。然而 ABA 是扮演傳遞逆境反應重要的訊息分子之一, 為了進一步分析 ABA 影響, 我們做不同時間點分析, 收取 ABA 處理 0.5、1、3、6 小時進行北方墨點法分析(圖六)。由結果得知, pre-miR828 表現量在 ABA 處理 0.5 小時開始有抑制 miR828 表現量, 而在 3 小時更降低為 0.38 倍。ABA 亦會有抑制 miR828 表現量的情形。

此外, 我們亦收取經由 MeJA 與 ethylene 處理的甘藷葉片, 進行北方墨點法分析(圖五、圖七), 以僅處理水的當作控制組。由結果得知, MeJA 與 ethylene 也會造成 miR828 表現量降低的情形, 分別為未處理的 0.4 與 0.54 倍。

在前人研究中，提供番茄葉片 MeJA 可以偵測到  $H_2O_2$  大量產生 (Orozco-Cárdenas and Ryan, 1999)。MeJA 和  $H_2O_2$  都是在植物傷害後扮演傳遞訊息的重要分子，而在我們實驗中，甘藷葉片在遭受機械性傷害後會透過  $H_2O_2$  的產生來抑制 miR828 的表現量，外加 MeJA 亦可抑制 miR828 表現量。MeJA 與  $H_2O_2$  兩者之間而是如何調控 miR828，我們藉由 NADPH oxidase 抑制劑 DPI 的事前處理，再處理 MeJA，並且收取葉片進行北方墨點分析(圖五)，以僅處理 DPI 的葉片當作控制組。由結果得知，DPI 會影響 MeJA 處理後 miR828 的表現量。在 DPI 存在時與僅處理 MeJA 比較，miR828 表現量有減少被抑制的情形。藉此我們推測，MeJA 誘導 NADPH oxidase 活化產生  $H_2O_2$ ，進而影響 miR828 的表現量。

前人研究在番茄受傷必須透過 ethylene 產生，進而誘導 JA 生成，並與 JA 共同調控 *pin* 基因(O'Donnell et al., 1996)；但在冬南瓜則呈現相反的傳遞路徑，JA 活化 *ACC synthase* 基因，進而生合成 ethylene (Watanabe and Sakai, 1998)。MeJA 與 ethylene 皆會造成 miR828 表現量降低，但兩者是如何調控 miR828 的表現情形則尚未知。

我們藉由 JA 生合成抑制劑 DIECA 的前處理，再處理 ethylene 供應劑 CEPA，並且收取葉片進行北方墨點分析(圖七 B)，以僅處理 DIECA 的葉片當作控制組。由結果得知，DIECA 不會影響到 MeJA 處理後的 miR828 表現量，但會影響 CEPA 處理後 miR828 的表現量。在 DIECA 存在時與僅處理 CEPA 比較，miR828 表現量有減少被抑制的情形，本來僅處理 CEPA 後 miR828 表現量降低為 0.54 倍(圖七 A)，則在 DIECA 存在下再處理 CEPA 後 miR828 表現量回復為 1 倍(圖七 B)。

我們亦反之證明，藉由 ethylene 生合成抑制劑 AVG 的事前處理，再處理 MeJA，並且收取葉片進行北方墨點分析(圖七 B)，以僅處理 AVG 的葉片當作控制組。由結果得知，AVG 不會影響到 MeJA 及 CEPA 處理後的 miR828 表現量，

無論有無 AVG 存在下再處理 MeJA 後 miR828 表現量依然降低為 0.5 倍。

由實驗得知 ethylene 誘導 JA 產生進而影響 miR828 的表現量；MeJA 誘導 NADPH oxidase 活化產生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 進而影響 miR828 的表現量。我們進一步探討 ethylene 抑制 miR828 的表現量也透過 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。我們收取 NADPH oxidase 抑制劑 DPI 的前處理，再外加 ethylene 的供應劑 CEPA 的葉片進行北方墨點分析(圖七 A)，以僅處理 DPI 的葉片當作控制組。由結果得知，DPI 會影響 CEPA 處理後 miR828 的表現量。僅處理 CEPA 後 miR828 表現量降低 0.54 倍(圖七 A)，則在 DPI 存在下再處理 CEPA 後 miR828 表現量降低為 0.8 倍(圖七 B)，所以在 DPI 存在時與僅處理 CEPA 比較，miR828 表現量有減少被抑制的情形。

綜合以上結果，我們推測 ethylene 誘導 JA 產生，再活化 NADPH oxidase 產生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 進而影響 miR828 的表現量。

### 2.3 CO 與 miR828 表現之關係

CO 近年來前人研究得知其具有扮演生物訊息傳遞分子之一的功能，且 CO 參與植物調控鎘逆境(Han et al., 2008)與鹽分逆境(Xie et al., 2008)的反應，減緩氧化逆境的傷害。在本實驗室亦探究 CO 與傷害的關係，初步得知 CO 抑制傷害誘導的 *IPO* 基因產生。我們分析不同濃度 CO 供應劑 Hematin 對甘薯葉於傷害的影響(圖八)。在北方墨點法分析結果得知，經由濃度為 10 μM 以上的 hematin 處理後，再傷害，miR828 表現量有減少被抑制的情形。

### 2.4 Ca<sup>2+</sup> 與 miR828 表現之關係

Ca<sup>2+</sup> 屬於重要的二級訊息傳導分子，我們事先利用 EGTA 處理葉片 12 小時，再利用鑷子進行機械性傷害，並在 3 小時後收取葉片進行北方墨點分析(圖九)，以僅處理 EGTA 的葉片當作控制組。由結果得知，EGTA 會影響傷害後

miR828 的表現量。在 EGTA 存在時與僅處理傷害比較，pre-miR828 表現量有減少被抑制的情形。Ca<sup>2+</sup> 也參與 miR828 的調控路徑。

### 三、 miR828 標的基因

#### 3.1 miR828 標的基因預測

miRNA 與其標的基因的辨識方式是藉由序列的互補性來決定。在預測標的基因時，其與 miRNA 的序列互補性可允許三個錯配(mismatches)，且將 G:U 視為配對的(Rhoades et al., 2002)。但亦有些 miRNA 的標的基因例外，不屬於與 miRNA 序列互補性為三個以內錯配。此 miRNA 的 5 端序列與標的基因互補性是重要的(Bartel, 2004)，且 miRNA 的 5 端序列互補性需包含七個完全配對或接近配對(Doench and Sharp, 2004)；而其 3 端序列的互補性就顯得較不重要，可容許較多錯配(Bartel, 2004)。

現今預測 miRNA 的標的基因可透過表現序列標幟(Expressed sequence tag, EST)或全基因組隨機序列(whole-genome shotgun)的資料庫進行序列分析比對，或者直接 cDNA clone 鈎取(Axtell et al., 2007)。我們採取直接 cDNA clone 進行鈎取 miR828 標的基因，利用 miR828 的序列進行 RACE 實驗(圖十)，由 5'RACE 與 3'RACE 結果所得片段進行定序分析，得到三個可能為 miR828 標的基因，分別為 *RPK* (*receptor protein kinase*)、*TLD* 和 *MYB*，並且分別利用基因的專一引子進行 RACE 實驗鈎取序列全長。藉由與 miR828 序列的互補性進行初步鑑定三個 miR828 標的基因的可能性。在圖十一顯示 *RPK* 與 miR828 序列互補性屬於與 miRNA 的 5 端序列七個完全配對特性；*TLD* 與 miR828 序列互補性中有三個錯配；*MYB* 與 miR828 序列互補性中有一個錯配。*RPK*、*TLD* 和 *MYB* 可能為 miR828 標的基因。

#### 3.2 miR828 標的基因序列鈎取與比對

### RPK (receptor protein kinase) (圖十一)

利用 *RPK* 基因的專一引子進行 RACE 與 RT-PCR 鈎取序列全長，由結果獲得 *RPK* cDNA 全長為 2313 bps，開放閱讀框架(open reading frame, ORF)則為 1863 bps，蛋白質全長 621 個胺基酸，並將胺基酸序列在 NCBI 進行蛋白質比對，得知甘藷 *RPK* 與 hypothetical protein [Vitis vinifera]相似度為 68%；與 protein kinase [Medicago truncatula]相似度為 66%；與 putative systemin receptor SR160 (Os05g0414700) [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]相似度為 63%；與 putative leucine-rich repeat receptor protein kinase (AT5g48380) [Arabidopsis thaliana]相似度為 60%。利用 NCBI 蛋白質功能區搜尋比對，*RPK* 主要有 LRRNT ( leucine-rich repeats)與 PTKc ( protein tyrosine kinase family catalytic domain)兩區域。LRR-RPKs 具有參與植物生長發育與調控防禦相關機制的功能。在植物中有多種 LRR-RPKs，但在 LRR-RPKs 之中卻只有不到 10 個知其確切功能。

### TLD (圖十一)

利用 *TLD* 基因的專一引子進行 RACE 與 RT-PCR 鈎取序列全長，由結果獲得 *TLD* cDNA 全長為 1536 bps，開放閱讀框架(open reading frame, ORF)則為 1173 bps，蛋白質全長 391 個胺基酸，並將胺基酸序列在 NCBI 進行蛋白質比對，得知甘藷 *TLD* 與 unnamed protein product [Vitis vinifera]相似度為 63%；與 oxidation protection protein-like (Os02g0754000) [Oryza sativa Japonica Group]相似度為 54%；與 unknown protein (AT4g39870) [Arabidopsis thaliana]相似度為 54%；與 nucleolar protein-like (Os06g0221100) [Oryza sativa Japonica Group] 相似度為 51%。利用 NCBI 蛋白質功能區搜尋比對，*TLD* 主要有真核生物的 TLDC 區域或

真菌的 OXR1 區域(Oxidation resistance protein)。TLD 功能現今未知，推測其可能具有酵素功能(NCBI)。

### MYB (圖十一)

利用MYB基因的專一引子進行RACE與RT-PCR鈎取序列全長，由結果獲得MYB cDNA全長為720 bps，將其序列在NCBI進行序列比對，與牽牛花MYB和棉花MYB2高相似度，唯獨甘藷MYB在前段約100 bps處後面多出一段完全不相似的68 bps序列，並且在這68 bps中含有一終止密碼子，造成蛋白轉譯提早停止。推測此MYB可能為假基因，不具有功能性表現。假基因現今研究功能尚不清楚，目前已知研究的有假基因藉由產生small interfering RNAs影響基因的表達(Tam et al., 2008)，及假基因轉錄出假RNA進而調控同源基因RNA的穩定性(Hirotsune et al., 2003)。

### 3.3 miR828 標的基因表現分析

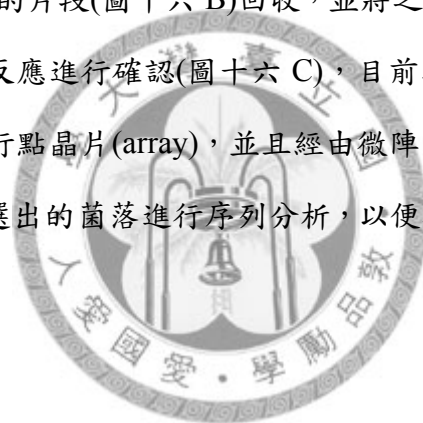
進一步確認分析 miR828 可能的標的基因 *RPK*、*TLD*、*MYB* 在甘藷葉片傷害後表現情形，分別收取葉片傷害後 0.5、1、3 和 6 小時，進行 RT-PCR 分析(圖十二)。由實驗結果得知，*RPK* 在傷害後短時間表現量快速增加，在收取樣品的時間點中於 0.5 小時表現量為最大值；*TLD* 在傷害後短時間內些微下降，但於 3 小時表現量上升；而 *MYB* 在傷害後隨著時間表現量增加。而在不同藥劑處理分析實驗中，我們測試 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、NO 與 MJ 對 *RPK*、*TLD*、*MYB* 表現情形的影響(圖十二)。由實驗結果得知，*RPK* 在這些藥劑處理後表現量並無太大差別；*TLD* 則只有些微上升；而 *MYB* 在這些藥劑處理後表現量有增加的情形。

由於 *RPK*、*TLD* 在甘藷葉片傷害後表現量會有上升情形，卻在傷害相關誘導劑處理後無太大差別。所以我們藉由事先處理 NADPH oxidase 抑制劑 DPI 與 NOS 抑制劑 NMMA 來分析傷害後 *RPK*、*TLD* 表現量(圖十三、十四)。由結果得

知，DPI 與 NMMA 會抑制傷害誘導 *RPK*、*TLD* 表現的情形。證實植物遭受機械性傷害後調控 *RPK*、*TLD* 的表現量可能藉由 NADPH oxidase 產生  $H_2O_2$  與 NOS 產生 NO 的影響。

#### 四、 甘藷 miRNA 鈎取

我們採取 Lu 等人於 2007 年發於 *Methods* 的方法進行鈎取甘藷 miRNA (圖十六)。我們選取甘藷植株進行機械性傷害 0、1 與 3 小時，並且分離 20-30 nts 的小片段 RNA (圖十六 A)。將分離出的 20-30 nts 的小片段 RNA 分別接上 5 端與 3 端接合子 (5' adaptor 與 3' adaptor)，並且將之反轉錄成 cDNA，再進行 PCR 反應並將所得為 70-85 nts 大小的片段 (圖十六 B) 回收，並將之構築於 yT&A 載體上。再以 M13 引子進行 PCR 反應進行確認 (圖十六 C)，目前我們約獲得 100 株菌落。待獲得更多菌落，再進行點晶片 (array)，並且經由微陣列晶片 (microarray) 篩選傷害相關的菌落，再將篩選出的菌落進行序列分析，以便獲得專屬甘藷傷害相關的 miRNA。



## 第四章 討論

### 一、 miR159、miR407、miR828 表現情形

由於未有甘藷 miRNA 的鈎取與研究，且 miRNA 序列在演化具有高度的保留性，我們利用其具有高度保留性的特性，用阿拉伯芥 miRNA 的序列當作探針偵測甘藷植株 miR159、miR407、miR828 表現情形(圖一)。

miR159 在演化是屬一高度保留性 miRNA，在種子植物(seed-bearing plants)中皆可發現。在前人研究中 miR159 在韌皮部汁液中扮演著傳遞訊息的角色(Yoo et al., 2004)，參與生長發育與逆境調控(Reyes et al., 2007)，而我們利用阿拉伯芥 miR159 的序列當作探針偵測到在甘藷植株莖中有 miR159 大量表現，而在葉中則偵測到極少量。由這結果間接推測甘藷的 miR159 可能亦存於汁液中扮演著傳遞訊息的角色，參與甘藷生長發育與逆境調控，但在機械性傷害後並無造成 miR159 表現量有所差異，所以 miR159 可能與甘藷傷害逆境防禦調控無相關。

miR407 在阿拉伯芥中發現，而且具有兩成員，表現在全株植株上，而在其他物種尚未有對 miR407 進行偵測或分析實驗(Sunkar and Zhu, 2004)。而我們利用阿拉伯芥 miR407 的序列當作探針亦無偵測到在甘藷植株中有 miR407 的表現。

miR828 被認為一非保留性的 miRNA，目前只在阿拉伯芥中發現，主要表現在果莢(siliques)上，但 miRNA 電腦分析預測上，卻在其他物種上發現可能存在著 miR828 或同質性序列(orthologs)，如：葡萄(*Vitis vinifera*)、水稻(*Oryza sativa*)、白楊(*Populus trichocarpa*)、乳漿大戟(leafy spurge)、油菜(*Brassica*)，其中某些物種已獲得證實(Rajagopalan et al., 2006)。而我們利用阿拉伯芥 miR828 的序列當作探針偵測到在甘藷植株葉片中有 miR828 表現，而在莖中則沒有。相同的 miRNA 在不同物種間也可能扮演不同角色，表現區域也可能不同(Comber et al., 2006)。在阿拉伯芥中 miR828 主要表現在果莢(siliques) (Rajagopalan et al., 2006)；而甘藷



miR828 則在葉中，且在機械性傷害後 miR828 表現量有被抑制情形(圖二)，所以 miR828 可能參與甘藷傷害逆境防禦調控，藉由 miR828 表現量降低而使其標的基因表現達到參與調控傷害逆境防禦機制。

在傷害防禦機制上，通常是藉由一連串的訊息分子傳遞產生(Ryan, 2000)。這些訊息分子包括了一氧化氮(NO)、活性氧(ROS)、植物荷爾蒙，如：離層酸(ABA)、乙烯(ethylene)、茉莉酸(JA)...等，以及從受損細胞壁釋放出來的多醣類(polysaccharides)。我們測試一些傷害防禦機制相關的分子對 miR828 表現量的影響，這些訊息分子之中我們外加過氧化氫(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、一氧化氮(NO)、甲基茉莉酸(MeJA)、離層酸(ABA)及乙烯(ethylene)都能抑制 miR828 表現量(圖三、圖五、圖六、圖七)。傷害防禦機制相關的分子對 miR828 表現量的影響說明著抑制 miR828 進而可能調控甘藷傷害逆境防禦。

## 二、 miR828 的訊息傳遞過程

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 與 NO

在植物的防禦機制，H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的主要來源是藉由 NADPH-dependent oxidase 系統(Lamb and Dixon, 1997)。我們事先將葉片處理 NADPH oxidase 抑制劑 DPI 抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生合成，再傷害葉片，發現 DPI 會影響傷害後 miR828 的表現量，傷害後 miR828 被抑制的效果減低(圖四)。甘藷葉片遭受機械性傷害後是藉由 NADPH oxidase 產生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 達到抑制 miR828 表現量。但 DPI 影響傷害後的 miR828 表現量並非完全抑制傷害後 miR828 降低的效果，所以可能是因 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的生成來源透過多樣的途徑而 NADPH-dependent oxidase 系統只是其中之一，或者另有其他訊息分子也參與在其中。

NO 產生方式主要藉由兩種酵素的作用方式產生(Wendehenne et al., 2004)，一為 NO synthase (NOS)，另一為 Nitrat reductase (NR)。而目前在植物中只有兩

個 NOS 被確認，且皆防禦反應相關，一為 pathogen inducible NOS (iNOS)，另一為受到植物荷爾蒙 ABA 活化的 AtNOS1。在實驗室先前研究，將葉片處理 NOS 抑制劑 NMMA，再傷害葉片，發現 NO 的染色訊號消失 (Jih *et al.*, 2003)。我們也發現 NMMA 會影響傷害後 miR828 的表現量，傷害後 miR828 被抑制的效果減低(圖四)。甘藷葉片遭受機械性傷害後是藉由 NOS 產生 NO 進而抑制 miR828 的表現量。NO 產生的另一途徑 NR 也是參與防禦反應相關(Wendehenne *et al.*, 2004)，而 NMMA 是抑制 NOS 產生 NO 的途徑，NMMA 影響傷害後的 miR828 表現量並非完全抑制傷害後 miR828 降低的效果，或許傷害亦透過 NR 產生 NO 或者另有其他訊息分子也參與傳遞訊息。

前人研究 NO 會影響 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的產生與功能(Wendehenne *et al.*, 2004)，在植物防禦機制上，NO 扮演重要角色調控 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的含量，不僅研究有指出 NO 會快速消除 ROS，或是 NO 誘導大量 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的產生。而我們實驗結果得知，在 DPI 存在時再處理 SNP 與僅處理 SNP 比較，miR828 表現量有減少被抑制的情形(圖五)；而我們亦有反之證明，在 NMMA 存在時再處理 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 無影響 miR828 被抑制的情形。推測甘藷葉片遭受機械性傷害後，藉由 NOS 產生 NO 進而誘導活化 NADPH oxidase 產生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 進而影響 miR828 的表現量(圖十五)。在實驗室先前研究，將葉片處理 SNP 後，再供應 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，發現 NO 會抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理後的 *ipomoelin (IPO)* 基因表現，認為甘藷中 NO 會降低 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的含量(Jih *et al.*, 2003)，而我們利用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 抑制劑再外加 SNP 實驗(圖五)認為甘藷傷害後產生的 NO 會促使 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量增加進而抑制 miR828。或許在甘藷中 NO 亦扮演著雙重角色，藉由 NO 的含量的不同，不僅觸發 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的產生，又調節過多的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 造成的影響。

## MeJA 與 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

MeJA 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 都是在植物傷害後扮演傳遞訊息的重要分子，而在我們實驗中，甘藷葉片在遭受機械性傷害後會透過 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的產生來抑制 miR828 的表現量，

外加 MeJA 亦可抑制 miR828 表現量。而 MeJA 與 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 兩者之間關係，由實驗結果得知，DPI 會影響 MeJA 處理後 miR828 的表現量(圖五、圖七)。在 DPI 存在時與僅處理 MeJA 比較，miR828 表現量有減少被抑制的情形。藉此我們推測，MeJA 誘導活化 NADPH oxidase 產生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，進而影響 miR828 的表現量。前人研究指出，提供番茄葉片 MeJA 或是傷害可以偵測到 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 大量產生 (Orozco-Cárdenas and Ryan, 1999)；DPI 完全抑制 MeJA 引起的 *ipomoelin (IPO)* 基因表現。所以植物遭受到傷害後誘導 MeJA 產生進而活化細胞膜上 NADPH oxidase 產生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 及透過其他訊息分子，而調控防禦基因表現。

此外，我們結果知 MeJA 和 NO 皆會誘導 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 產生，且前人研究也指出，JA 也會誘導 NO 生合成(Wendehenne et al., 2004)。推測植物遭受到傷害後誘導 MeJA 產生進而活化 NOS 產生 NO 再活化 NADPH oxidase 產生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 或者 MeJA 本身透過過其他分子，而調控防禦基因表現(圖十五)。可藉由處理 NOS 抑制劑 NMMA 後，再外加 MeJA，分析甘薯葉片中 NMMA 對 MeJA 抑制 miR828 的影響，來進一步證實 JA 會透過誘導 NO 產生再促使 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生成，進而調控下游防禦相關基因。

## Ethylene 與 JA

Ethylene 和 JA 都是在植物傷害後扮演傳遞訊息的重要分子，而在我們實驗中，在甘薯葉片處理 ethylene 會抑制 miR828 的表現量，外加 MeJA 亦可抑制 miR828 表現量。在番茄受傷必須透過 ethylene 產生，進而誘導 JA 生成 (O'Donnell et al., 1996)；但在冬南瓜則呈現相反的傳遞路徑，JA 活化 *ACC synthase* 基因，進而生合成 ethylene (Watanabe and Sakai, 1998)。而 ethylene 與 JA 兩者之間對 miR828 的關係，由我們實驗結果得知，JA 生合成抑制劑 DIECA 會影響 ethylene 處理後 miR828 的表現量，而 ethylene 生成抑制劑 AVG 不會影響 MeJA 處理後 miR828 的表現量(圖七)。這說明著 ethylene 會透過 JA 的生成調控 miR828 的表

現量。

此外，MeJA 會誘導活化 NADPH oxidase 產生  $H_2O_2$ ，進而影響 miR828 的表現量。我們另用處理 NADPH oxidase 抑制劑 DPI 後，再外加 ethylene，分析甘薯葉片中 DPI 對 ethylene 抑制 miR828 的影響，在 DPI 存在時與僅處理 ethylene 比較，miR828 表現量有減少被抑制的情形(圖七)，這說明著 ethylene 也透過  $H_2O_2$  調控 miR828。

綜合來說在植物防禦中，ethylene 會透過 JA 產生再促使活化 NADPH oxidase 產生  $H_2O_2$  生成，進而調控下游防禦相關基因(圖十五)。

## CO

CO 是近年來研究知其在植物體內也扮演生物訊息傳遞分子之一。除了參與生長發育外，在氧化逆境防禦調控上也是重要的，藉由活化氧化逆境防禦機制的酵素，如：superoxide dismutase (SOD)、catalase (CAT)、peroxidase...等，消除氧化造成的傷害(Han et al., 2008)。而我們實驗結果中，CO 會影響傷害後 miR828 的表現量，使得傷害後降低 miR828 表現量的情形被抑制(圖八)。CO 可能藉由清除植物體內  $H_2O_2$ ，而使得原本傷害透過  $H_2O_2$  抑制 miR828 表現量的情形被抑制或延遲。所以甘薯傷害防禦機制中，CO 可能會活化氧化逆境防禦機制的酵素，清除  $H_2O_2$  降低造成的氧化傷害(圖十五)。

## Ca<sup>2+</sup>

Ca<sup>2+</sup> 研究指出參與傷害反應路徑的早期訊息傳遞(Knight et al., 1992)。探究 Ca<sup>2+</sup> 是否參與傷害後 miR828 表現的調控，由實驗結果，Ca<sup>2+</sup> 螯合劑 EGTA 會影響傷害後 miR828 表現量，抑制傷害後降低 pre-miR828 表現量的情形。這說明著傷害防禦機制中 Ca<sup>2+</sup> 對於訊息傳遞的重要性。此外，植物傷害後細胞內 Ca<sup>2+</sup> 的

增加會促使 MeJA 生合成(Memelink et al., 2001)。而且我們外加 MeJA 降低 miR828 表現量(圖五、圖七)，Ca<sup>2+</sup>參與調控傷害後 miR828 表現，綜合推測可能植物傷害後細胞內 Ca<sup>2+</sup>的增加會促使 MeJA 生合成再抑制 miR828 表現，進而傳遞傷害反應。

### 訊息傳遞(圖十五)

miR828 在傷害後表現量降低，我們藉由不同誘導劑或抑制劑探討 miR828 的表現情形，由結果推測植物傷害後，植物傷害後細胞內 Ca<sup>2+</sup>的增加會促使 MeJA 生合成進而活化 NOS 產生 NO 再活化 NADPH oxidase 產生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，或者 MeJA 本身也會透過過其他分子，而抑制 miR828 表現進而調控 miR828 標的基因表現，藉此參與傷害防禦機制。此外，ethylene 也會透過 MeJA 抑制 miR828 表現，而 CO 會在之中清除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 進而抑制傳遞過程。

### 三、 miR828 標的基因表現情形

#### RPK (receptor protein kinase)

RPK利用NCBI蛋白質功能區搜尋比對主要有LRRNT (leucine-rich repeats)與PTKc (protein tyrosine kinase family catalytic domain)兩區域(圖十一)。LRR-RPKs具有參與植物生長發育與調控防禦相關機制的功能。而在我們實驗結果中，甘藷 RPK在傷害後短時間表現量快速增加，在收取樣品的時間點中於0.5小時表現量為最大值(圖十二)，與miR828傷害後表現情形較不呈現互補情形，為3小時為最小值。由於RPK與miR828序列互補性為與miRNA的5端序列九個完全配對而3端互補性較不嚴謹(圖十一)造成兩者基因表現互補情形不同。但前人研究指出，miRNA的5端互補性顯得比3端重要，且miRNA調控標的基因機制為降解mRNA或抑制蛋白質轉譯。若miRNA與其標的基因序列互補性高為降解mRNA；與miRNA互補性沒那麼高而只有與miRNA的5端序列互補則為調控標的基因的蛋

白質轉譯(Mallory et al., 2004)。而miR828與*RPK*表現互補情形較不同，且*RPK*與miR828的5端互補性高，推測miR828調控*RPK*的機制可能為抑制蛋白質轉譯層面。由於此類型的調控機制多為動物miRNA，且植物miRNA對於此類型的調控機制尚不明確，只有Mallory等人研究推測植物某些miRNA調控標的基因亦與動物的調控機制相似。所以我們也著手進行植物體內實驗(*in vivo* miRNA-directed cleavage)進一步證實miR828調控*RPK*的機制為抑制蛋白質轉譯層面。

*RPK*在傷害後短時間有大量表現的情形，且為一種receptor protein kinase，推測其可能為傷害早期反應基因，扮演接收訊息分子放大傷害反應訊號。與傷害反應相關基因systemin receptor *SR160*也屬於LRR-RPKs之一，感受到systemin會活化MAPKs、Ca<sup>2+</sup>-dependence protein kinases與誘導產生ethylene、ROS和JA...等相關訊息傳導，放大傷害反應訊號。我們在外加H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、NO與MeJA等傷害相關誘導劑卻與對照組表現量無差別(圖十二)，而在處理處理NADPH oxidase抑制劑DPI與NOS抑制劑NMMA後再傷害誘導表現情形被抑制(圖十三)。推測甘藷*RPK*為訊息傳遞的上游基因，會受到傷害後產生的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>與NO誘導表現，接收其專一訊息分子並且放大訊號，如：MAPKs、ROS、NO與MeJA...等。所以可能我們直接外加甘藷葉片H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、NO與MeJA可能造成其負回饋作用，抑制基因的表現。或者推測為miR828調控*RPK*的機制為抑制蛋白質轉譯層面，所以*RPK* mRNA的表現量在傷害誘導劑處理下無改變，直接藉由miR828的量減少進而增加*RPK*蛋白質的累積增加。

### TLD

TLD利用NCBI蛋白質功能區搜尋比對主要有真核生物的TLDC區域或真菌的OXR1區域(Oxidation resistance protein)。TLD功能現今未知，其可能具有酵素功能。而在我們實驗結果中，甘藷TLD在傷害後短時間內些微下降，而於3小時表現量上升(圖十二)，與miR828傷害後表現被抑制情形呈現相似互補情形。且TLD與miR828序列互補性中有三個錯配，G:U視為配對的，符合可能為

miRNA 標的基因的條件，調控降解 mRNA。所以我們也著手進行植物體內實驗 (*in vivo* miRNA-directed cleavage 或 modified RNA ligase-mediated 5' RACE) 進一步證實 miR828 能調控 *TLD* 基因。

但在外加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、NO 與 MeJA 中 *TLD* 表現量些微上升(圖十二)，與 miR828 傷害後表現被抑制情形呈現較不相似互補情形，*TLD* 上升的量與 miR828 抑制量不相對。推測我們直接外加甘藷葉片 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、NO 與 MeJA 可能造成其負回饋作用，抑制 *TLD* 基因的表現。或者推測為 miR828 調控 *TLD* 的機制為降解 mRNA 與抑制蛋白質轉譯雙層面進行，如同 miR172 雙層面同時調控 *AP2-like* 基因 (Aukerman and Sakai, 2003; Chen, 2004)，所以 *TLD* mRNA 的表現量在傷害誘導劑處理下無改變，直接藉由 miR828 的量減少進而增加 *TLD* 蛋白質的累積增加。

### MYB

*MYB* 基因利用 NCBI 進行序列比對，與牽牛花 *MYB* 和棉花 *MYB2* 高相似度，而在我們實驗結果中，甘藷 *MYB* 在傷害後隨著時間表現量增加(圖十二)，且在外加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、NO 與 MeJA 中 *MYB* 表現量上升(圖十二)，與 miR828 傷害後表現被抑制情形呈現相似互補情形。且 *MYB* 與 miR828 序列互補性中有一個錯配，G:U 視為配對的，亦符合可能為 miRNA 標的基因的條件，調控降解 mRNA。所以我們也著手進行植物體內實驗 (*in vivo* miRNA-directed cleavage 或 modified RNA ligase-mediated 5' RACE) 進一步證實 miR828 能調控 *MYB* 基因。

但甘藷 *MYB* 在前段約 100 bps 處後面多出一段與牽牛花 *MYB* 和棉花 *MYB2* 完全不相似的 68 bps 序列，且在該 68 bps 中含有一終止密碼子，造成蛋白轉譯提早停止。因此我們推測此 *MYB* 可能為假基因，不具有功能性表現。假基因現今研究功能尚不清楚，目前已知研究的有假基因藉由產生 small interfering RNAs (siRNA) 影響基因的表達 (Tam et al., 2008)，及假基因轉錄出假 RNA 進而調控同源基因 RNA 的穩定性 (Hirotsune et al., 2003)。在阿拉伯芥中 miR828 調控 *MYB113* 與 *TAS4*

基因。而miR828與TAS4的兩者關係是miR828調控TAS4基因產生更多的siRNA，進而調控其他MYB基因的表現。推測此MYB可能受miR828調控產生siRNA進而影響其他基因的表現。

#### 四、 結論

植物遭受傷害後，促使NO與MeJA生合成，MeJA進而活化NOS產生NO，NO再活化NADPH oxidase產生H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，或者MeJA本身也會透過過其他分子，而抑制miR828表現進而調控miR828標的基因RPK、TLD、MYB的表現，藉由標的基因的表現進而可能參與傷害防禦機制。而miR828標的基因被miR828調控機制分別推測為RPK蛋白質轉譯可能受到miR828抑制；TLD則受到miR828調控機制的雙層面進行：TLD mRNA降解與TLD蛋白轉譯抑制；而MYB則是mRNA受到miR828降解。此外，ethylene也會透過MeJA抑制miR828表現，而CO會在之中清除H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>進而抑制此傳遞過程。





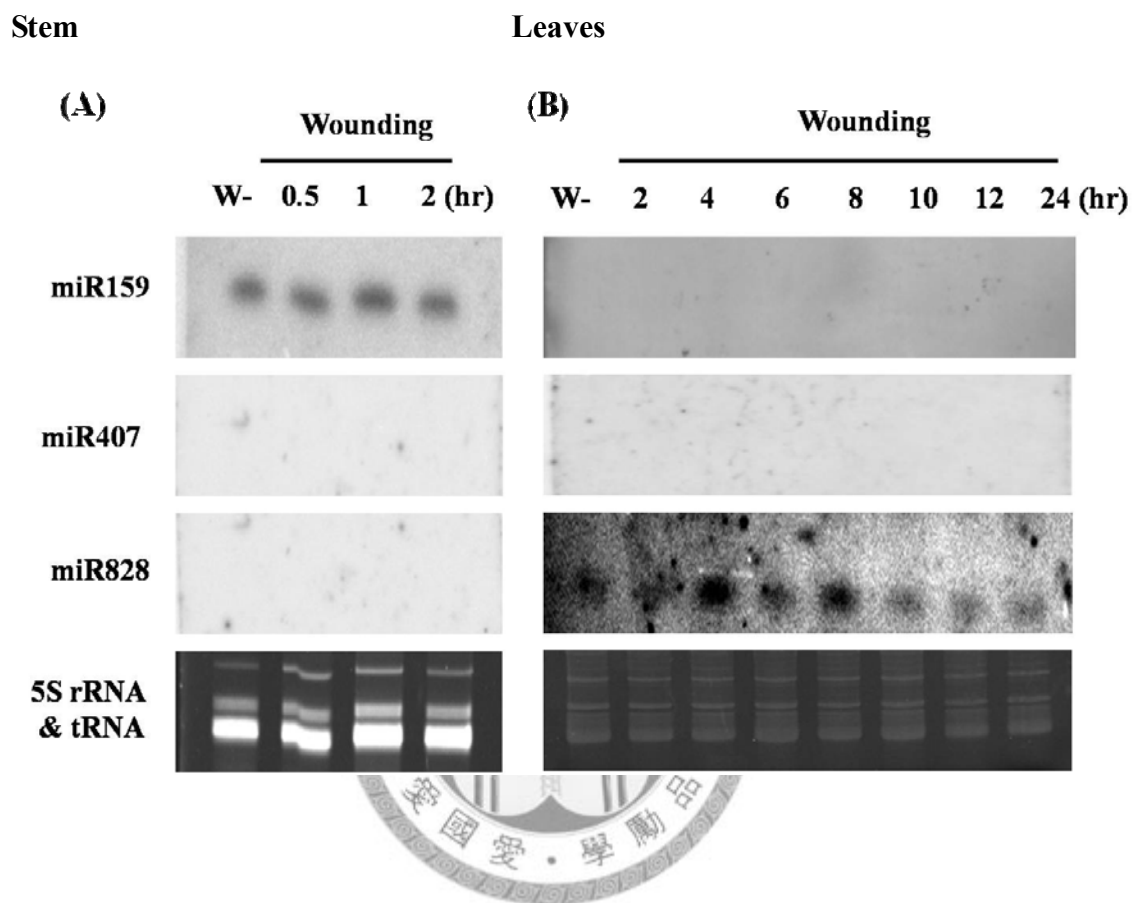
## 圖表

表一、本論使用的引子與 miRNA 序列

<b>miRNA clone</b>	
3-adapter	GTCAACGGGATCCCGACTGCTCAGGCGGTTCGCCGCCTGAGC
3-adapter primer	AGTCGGGATCCCGTTGAC
5-adapter	rCrArGUrCrArGUrGUrArCrGrGrArAUUrCrCrAUrG
5-adapter primer	CATGGAATTCCGTACACTGACTG
<b>In Vitro transcription</b>	
T3 Top strand	ATGAATTAACCCTCACTAAAG
T3 miR159	TAGAGCTCCCTTCAATCCAACTTTAGTGAGGGTTAATTCAT
T3 anti miR159	TTTGGATTGAAGGGAGCTCTACTTTAGTGAGGGTTAATTCAT
T3 anti miR407	TTTAAATCATATACTTTTGGTCTTTAGTGAGGGTTAATTCAT
T3 anti miR828	TCTTGCTTAAATGAGTATCCACTTTAGTGAGGGTTAATTCAT
<b>miR828 target gene RACE</b>	
RPK-5RACE-1	GGTGGAGAATCCGGGGATTGCAGTTGTGG
RPK-3RACE-1	CCACAACCTGCAATCCCCGGATTCTCCACC
MYB-3RACE-1	TGCTGCCACTCACTGCGTGTCTTTTCAGG
MYB-5RACE-1	CCTGAAAGAACACGCAGTGAGTGGCAGCA
TLD-3RACE-1	GAAAGGTGACTGAAGGCGTGCAGATTCTGG
TLD-5RACE-1	CCAGAATCTGCACGCCTTCAGTCACCTTTC
<b>RT-PCR</b>	
RPK-1R	ATGAGCCTCGCAAGCCC
RPK-8	GCAGAATACTCAGCACTCGGAG
MYB2-1	AGGTTTGAATAGGTGTGGTAAGAGTTG
MYB2-6	TATCTACATCAAAGTTCAATTCTGGGTC
TLDe-1	CAAAGAGAATTAGCTTCAAAGACTCC
TLDe-7	GATTGAGGATGACGGTGGTAAG
ACT F	ACCTTGCTGGACGTGACCTTACTGAT
ACT R	GTTGTCTCGTGGATTCCAGCAGCTT
<b>miRNA</b>	
miR159	UUUrGrGrAUUrGrArAGGGrArGrCUrCUrA
miR407	UUUrArArAUrCrAUrAUrArCUUUUrGrGU
miR828	UrCUUrGrCUUrArArAUrGrArGUrAUUrCrCrA

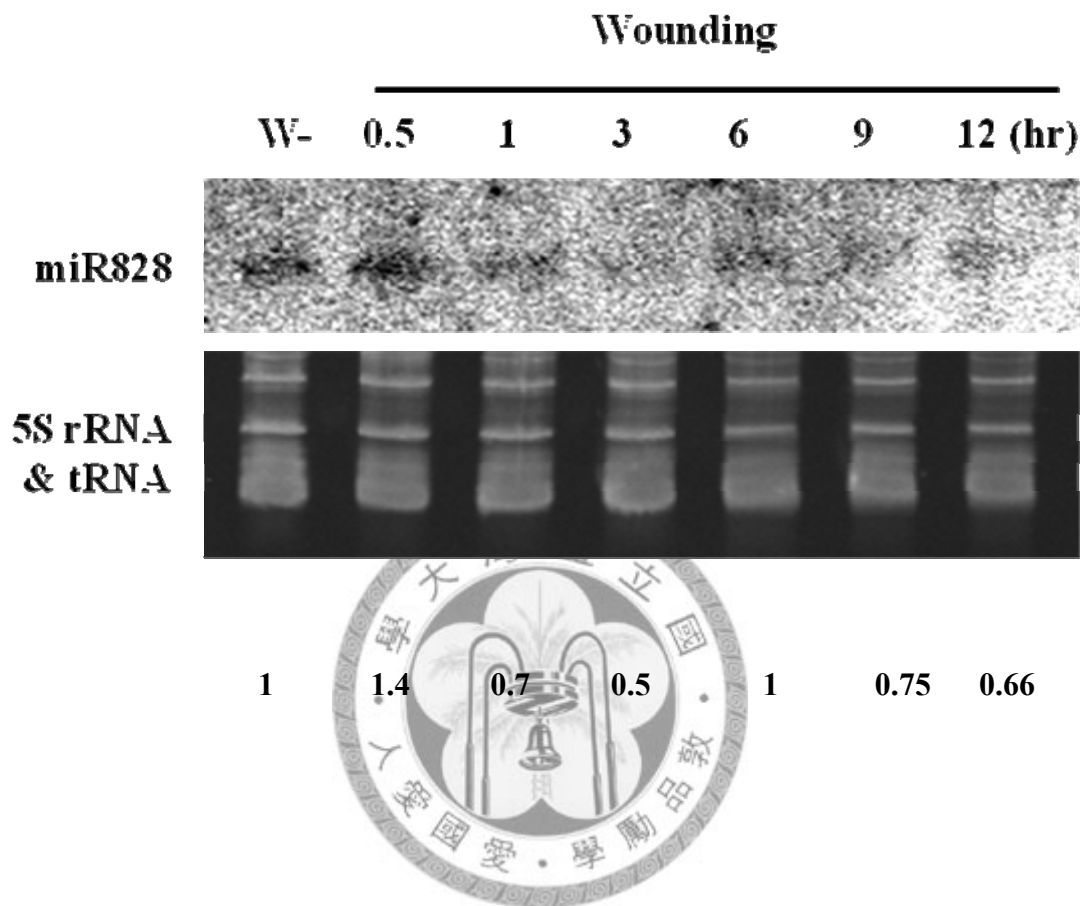
表二、藥劑使用對照表

Chemical	Concentration	
Abscisic acid (ABA)	100 $\mu$ M	
Aminoethoxyvinylglycine (AVG)	100 $\mu$ M	Ethylene biosynthesis inhibitor
2-chloroethylphosphonic acid (CEPA)	1 mM	Ethylene donor
Diethyldithiocarbamic acid (DIECA)	10 mM	JA biosynthesis inhibitor
Diphenylene iodonium (DPI)	100 $\mu$ M	NADPH oxidase inhibitor
Ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA)	1 mM	Ca <sup>2+</sup> chelator
50 mM glucose / 2.5 U/mL glucose oxidase (G/GO)		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> donor
Hematin		CO donor
Methyl jasmonate (MeJA)	50 $\mu$ M	
N <sup>G</sup> -monomethyl L-Arginine monoacetate (NMMA)	500 $\mu$ M	NO synthase inhibitor
sodium nitroprusside (SNP)	0.1 mM	NO donor



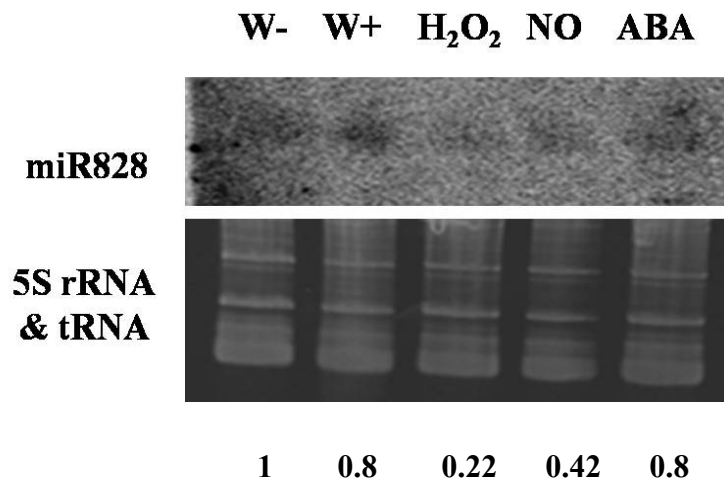
圖一、在機械性傷害處理下甘藷植株的 miRNA 表現情形。

以鑷子攝傷甘藷植株第二與三片葉，並收取傷害後不同時間點的莖(A)與葉片(B)，抽取 RNA 進行北方墨點法分析，分析 miR159、miR407 和 miR828 的表現情形。(n=1)



圖二、在機械性傷害處理下甘藷葉片的 miR828 表現情形。

挑選完全展開的甘藷葉片，由葉柄剪下後浸泡於水中 12 小時，再換水浸泡 12 小時以消除背景值，再以鑷子進行機械性傷害處理，並收取傷害後 0.5、1、3、6、9 與 12 小時不同時間點的葉片，抽取 RNA 進行北方墨點法分析，分析 miR828 的表現情形。(n=2)



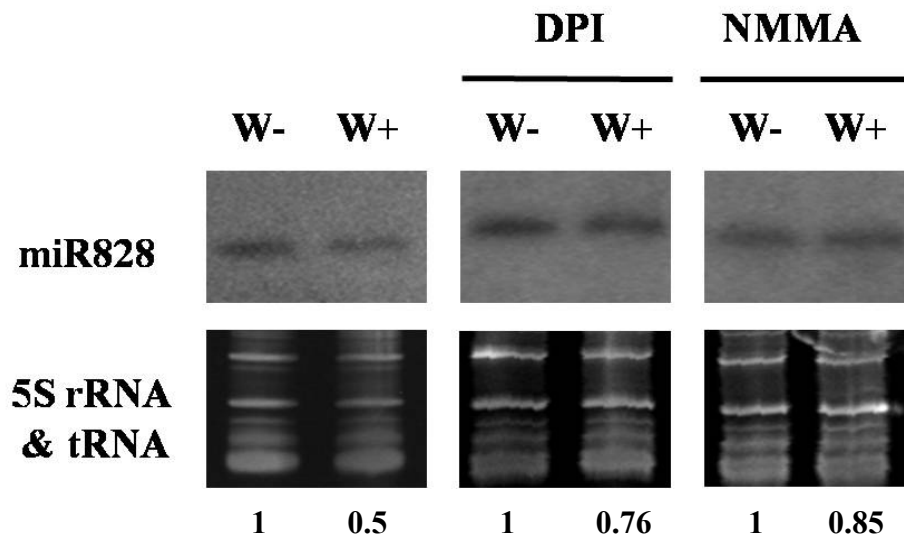
圖三、在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、NO 與 ABA 處理下甘藷葉片 miR828 的表現情形。

挑選完全展開的甘藷葉片，由葉柄剪下後浸泡於水中 12 小時，再換水浸泡 12 小時以消除背景值，再供應甘藷葉片 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、NO 與 ABA，並以只浸泡水的葉片作為控制組材料，收取處理 6 小時的葉片，抽取 RNA 進行北方墨點法分析，分析 miR828 的表現情形。(n=1)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 供應劑為 50 μM glucose (G) 與 2.5 U/mL glucose oxidase (GO)。

NO 供應劑為 0.1 mM sodium nitroprusside (SNP)。

ABA 使用濃度為 100 μM。

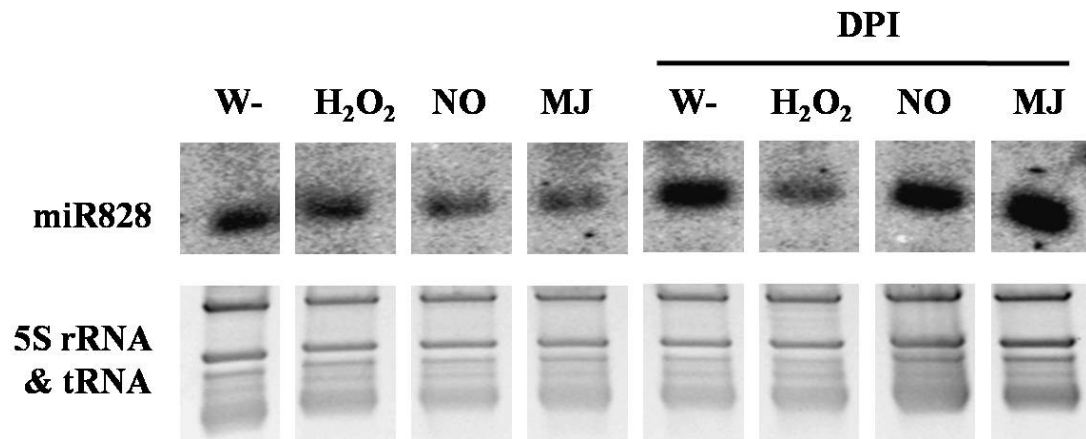


圖四、以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 或 NO 抑制劑處理下甘藷葉片再機械性傷害的 miR828 表現情形。

挑選完全展開的甘藷葉片，由葉柄剪下後浸泡於水中 12 小時，再換水、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 抑制劑或 NO 抑制劑浸泡 12 小時，樣品處理前再次更換水或抑制劑，並以鑷子攝傷葉片，並以只浸泡水或抑制劑的葉片作為控制組材料，收取處理 3 小時的葉片，抽取 RNA 進行北方墨點法分析，分析 miR828 的表現情形。(n=2)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 抑制劑為 100 μM diphenylene iodonium (DPI)。

NO 抑制劑為 500 μM N<sup>G</sup>-monomethyl L-Arginine monoacetate (NMMA)。



圖五、以  $H_2O_2$  抑制劑處理下甘藷葉片再供應  $H_2O_2$ 、NO、MeJA 的 miR828 表現情形。

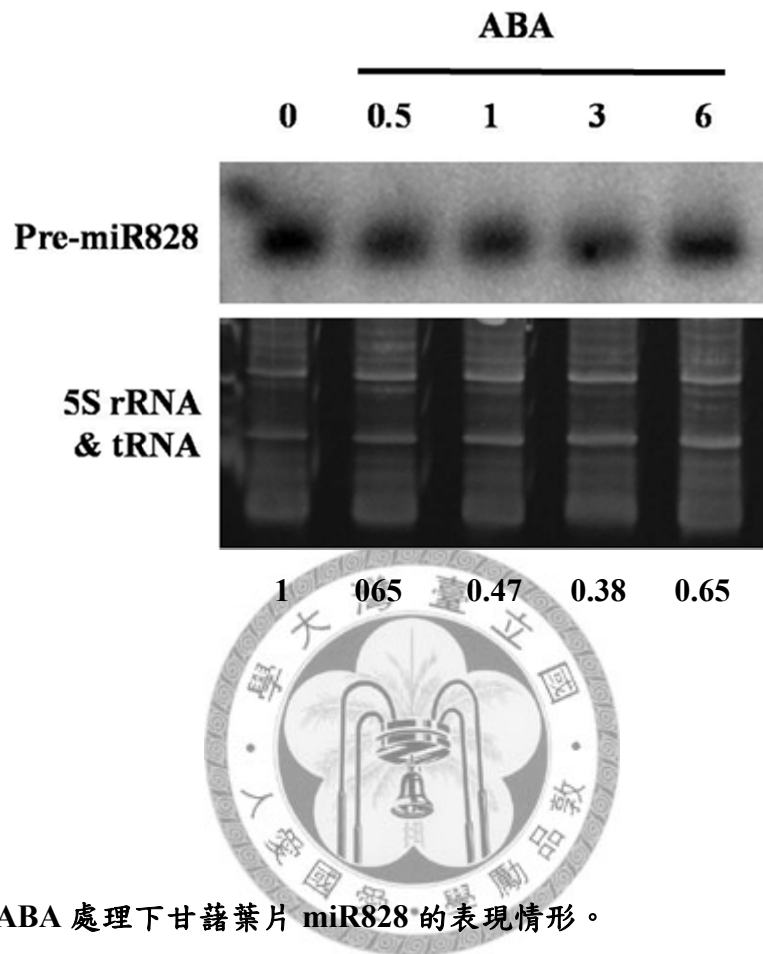
挑選完全展開的甘藷葉片，由葉柄剪下後浸泡於水中 12 小時，再換水或  $H_2O_2$  抑制劑浸泡 12 小時，樣品處理前再次更換水或抑制劑，再供應甘藷葉片  $H_2O_2$ 、NO 與 MeJA (MJ)，並以只浸泡水或抑制劑的葉片作為控制組材料，收取葉片抽取 RNA 進行北方墨點法分析，分析 miR828 的表現情形。(n=2)

$H_2O_2$  供應劑為 50  $\mu$ M glucose (G) 與 2.5 U/mL glucose oxidase (GO)。

NO 供應劑為 0.1 mM sodium nitroprusside (SNP)。

MeJA 使用濃度為 50  $\mu$ M。

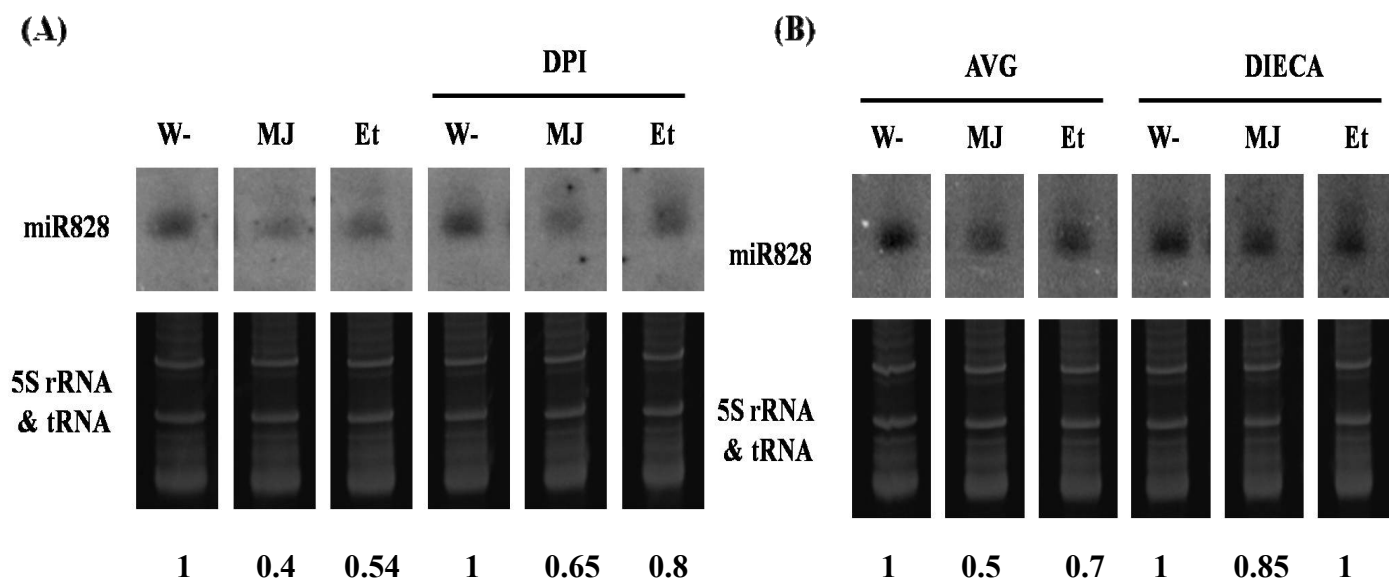
$H_2O_2$  抑制劑為 100  $\mu$ M diphenylene iodonium (DPI)。



圖六、在 ABA 處理下甘藷葉片 miR828 的表現情形。

挑選完全展開的甘藷葉片，由葉柄剪下後浸泡於水中 12 小時，再換水浸泡 12 小時以消除背景值，再供應甘藷葉片 100  $\mu$ M ABA，並以只浸泡水的葉片作為控制組材料，收取處理 0.5、1、3 與 6 小時不同時間點的葉片，抽取 RNA 進行北方墨點法分析，分析 miR828 的表現情形。(n=1)





圖七、在 MeJA、ethylene 處理下甘藷葉片 miR828 的表現情形。

挑選完全展開的甘藷葉片，由葉柄剪下後浸泡於水中 12 小時，再換水或抑制劑浸泡 12 小時以消除背景值，樣品處理前再次更換水或抑制劑，再供應甘藷葉片 MeJA (MJ) 與 ethylene (Et)，並以只浸泡水或抑制劑的葉片作為控制組材料，收取葉片抽取 RNA 進行北方墨點法分析，分析 miR828 的表現情形。(n=2)

(A) 以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 抑制劑處理下甘藷葉片再供應 MeJA 或 ethylene 的 miR828 表現情形。

(B) 以 JA 或 ethylene 抑制劑處理下甘藷葉片再供應 MeJA 或 ethylene 的 miR828 表現情形。

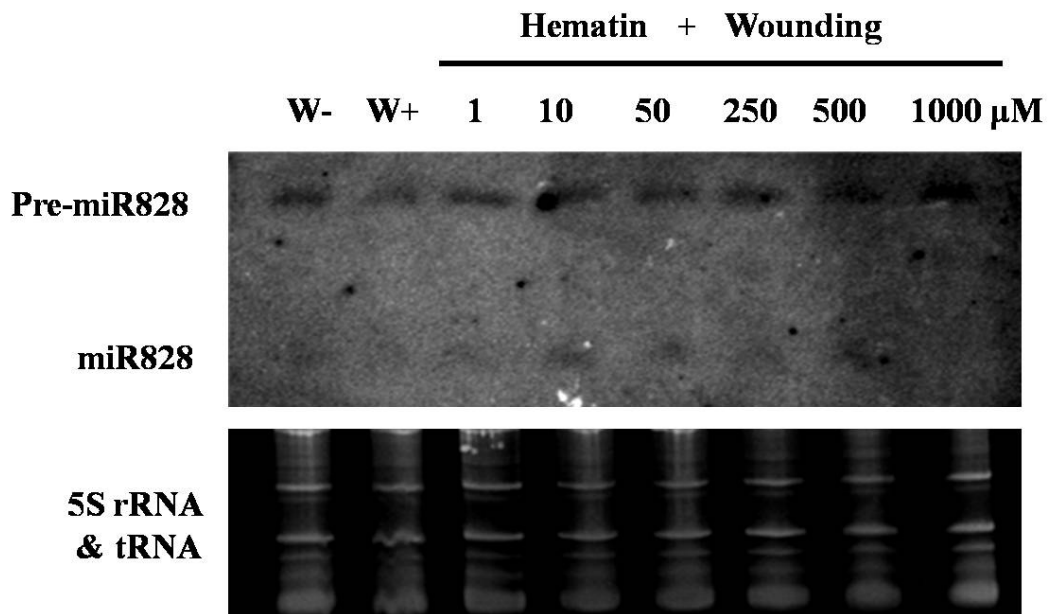
MeJA 使用濃度為 50 μM。

Ethylene 供應劑為 1 mM 2-chloroethylphosphonic acid (CEPA)。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 抑制劑為 100 μM diphenylene iodonium (DPI)。

Ethylene 抑制劑為 100 μM aminoethoxyvinylglycine (AVG)。

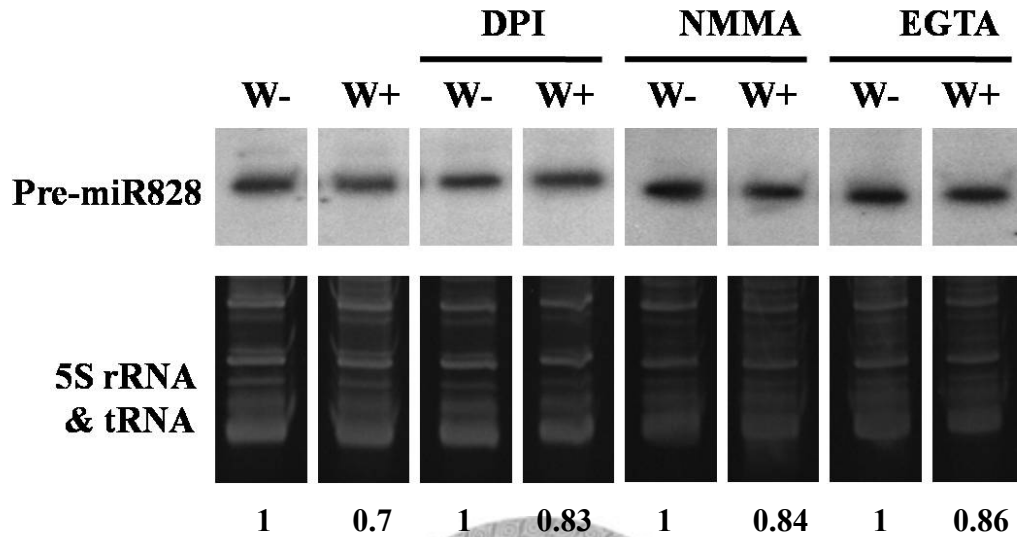
JA 抑制劑為 10 mM diethyldithiocarbamic acid (DIECA)。



圖八、在機械性傷害與供應 CO 處理下甘藷葉片 miR828 的表現情形。

挑選完全展開的甘藷葉片，由葉柄剪下後浸泡於水中 12 小時，再換水或不同濃度 CO 供應劑浸泡 12 小時以消除背景值，樣品處理前再次更換水或 CO 供應劑，再以鑷子進行機械性傷害處理，收取處理葉片，抽取 RNA 進行北方墨點法分析，分析 miR828 的表現情形。(n=1)

CO 供應劑為 Hematin。



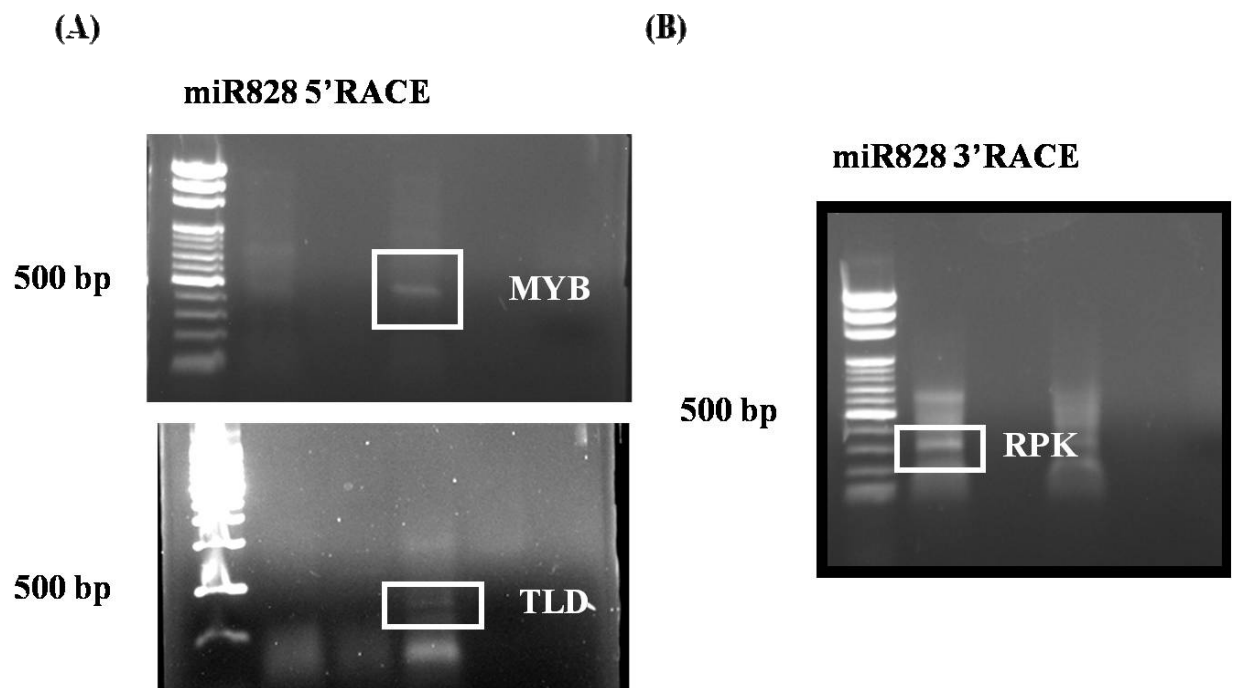
圖九、以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 或 NO 抑制劑、Ca<sup>2+</sup>螯合劑處理下甘藷葉片再機械性傷害的 miR828 表現情形。

挑選完全展開的甘藷葉片，由葉柄剪下後浸泡於水中 12 小時，再換水、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 抑制劑、NO 抑制劑或 Ca<sup>2+</sup>螯合劑浸泡 12 小時，樣品處理前再次更換水或抑制劑，並以鑷子攝傷葉片，並以只浸泡水或抑制劑的葉片作為控制組材料，收取處理 3 小時的葉片，抽取 RNA 進行北方墨點法分析，分析 miR828 的表現情形。  
(n=1)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 抑制劑為 100 μM diphenylene iodonium (DPI)。

NO 抑制劑為 500 μM N<sup>G</sup>-monomethyl L-Arginine monoacetate (NMMA)。

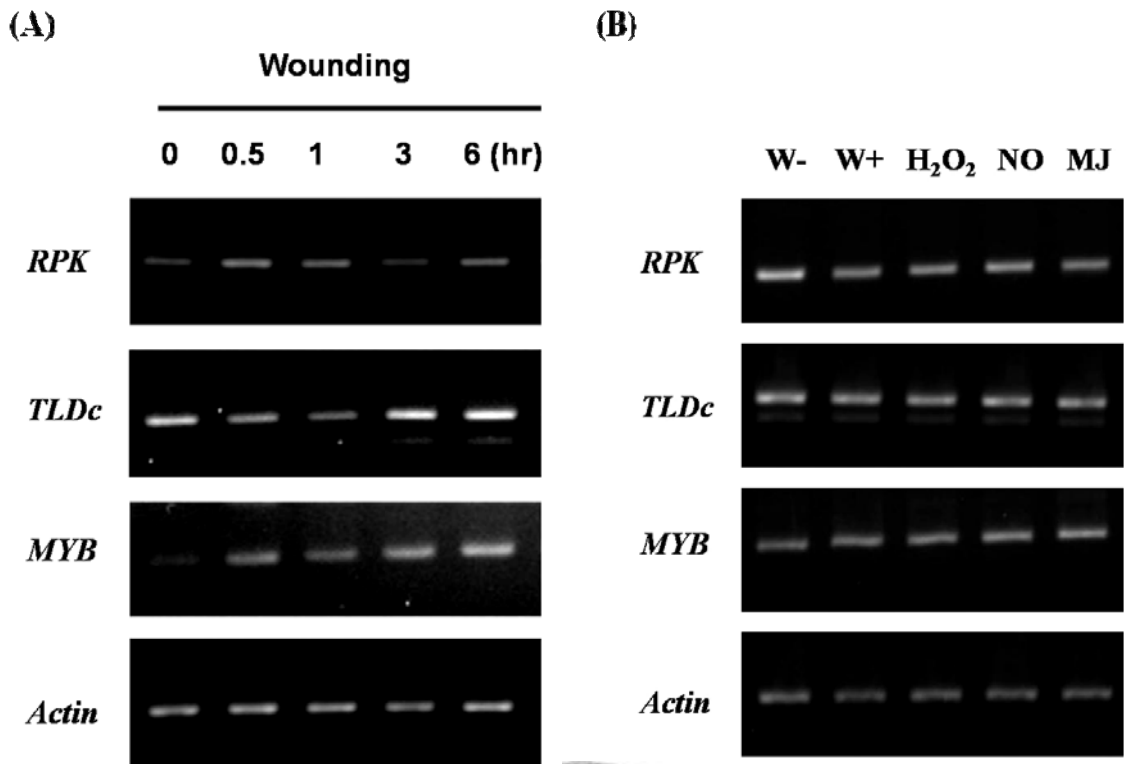
Ca<sup>2+</sup>螯合劑為 5 mM Ethylenebis(Oxyethylene-nitrilo)tetraacetic Acid (EGTA)。



圖十、甘藷 miR828 標的基因釣取。

利用 miR828 的序列進行 RACE 實驗，分別進行 5'RACE (A)與 3'RACE (B) 實驗之電泳圖。





圖十二、甘藷 miR828 可能的標的基因表現分析。

挑選完全展開的甘藷葉片，由葉柄剪下後浸泡於水中 12 小時，再換水或抑制劑浸泡 12 小時，樣品處理前再次更換水或抑制劑，並以鑷子攝傷葉片，並以只浸泡水或抑制劑的葉片作為控制組材料，收取葉片，抽取 RNA 進行 RT-PCR 分析。使用表一 RT-PCR 引子，其為 miR828 target site 兩側。

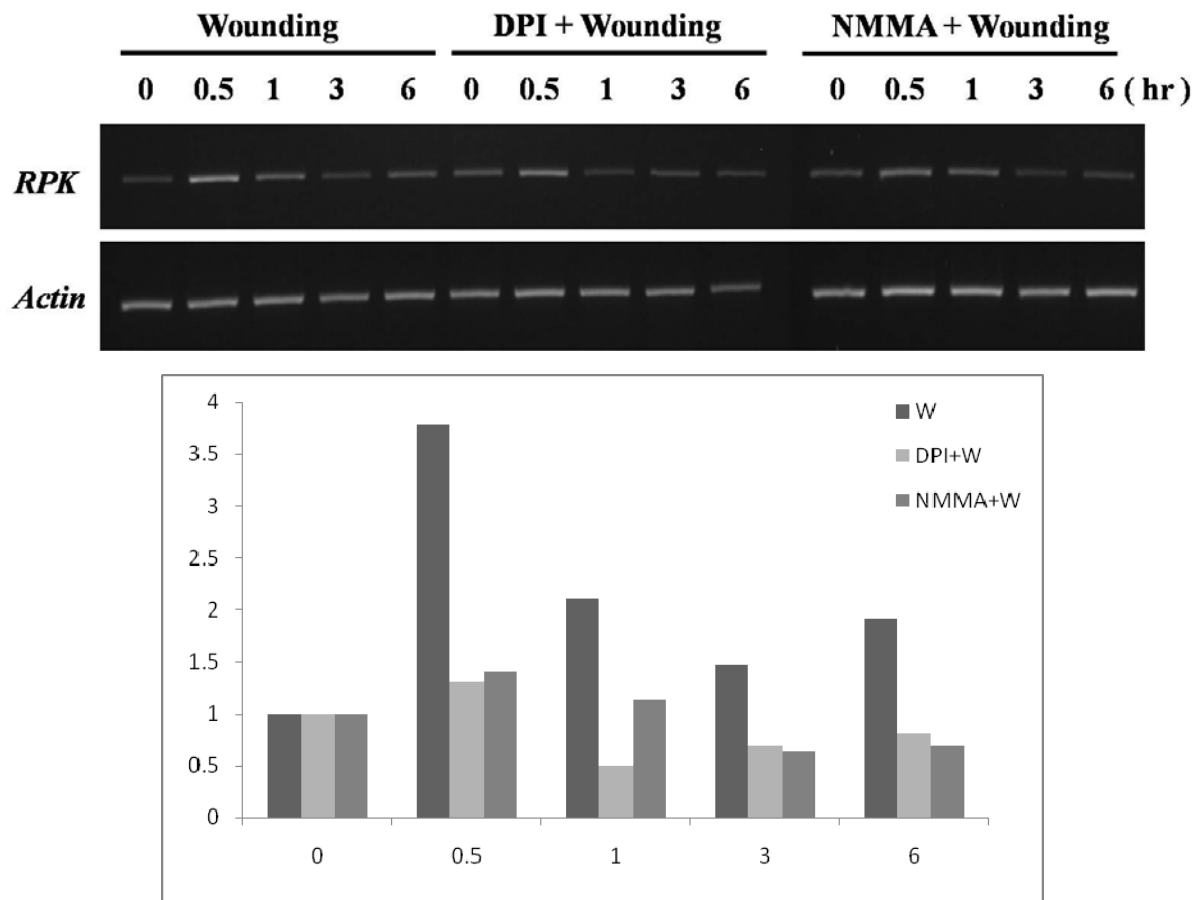
(A) 機械性傷害處理下甘藷葉片的 *RPK* (*receptor protein kinase*)、*TLDe* 與 *MYB* 基因表現情形。(n=2)

(B) 不同藥劑處理下甘藷葉片的 *RPK* (*receptor protein kinase*)、*TLDe* 與 *MYB* 基因表現情形。(n=1)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 供應劑為 50 μM glucose (G) 與 2.5 U/mL glucose oxidase (GO)。

NO 供應劑為 0.1 mM sodium nitroprusside (SNP)。

MeJA 使用濃度為 50 μM。

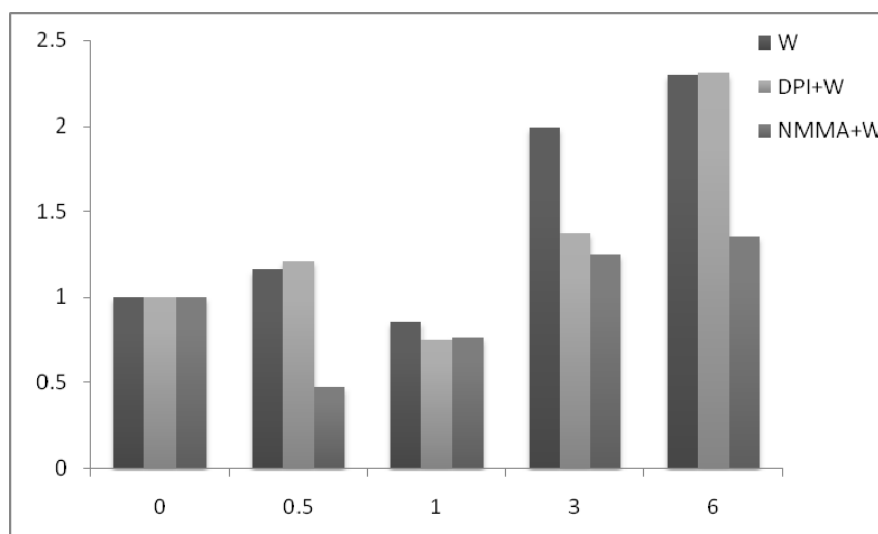
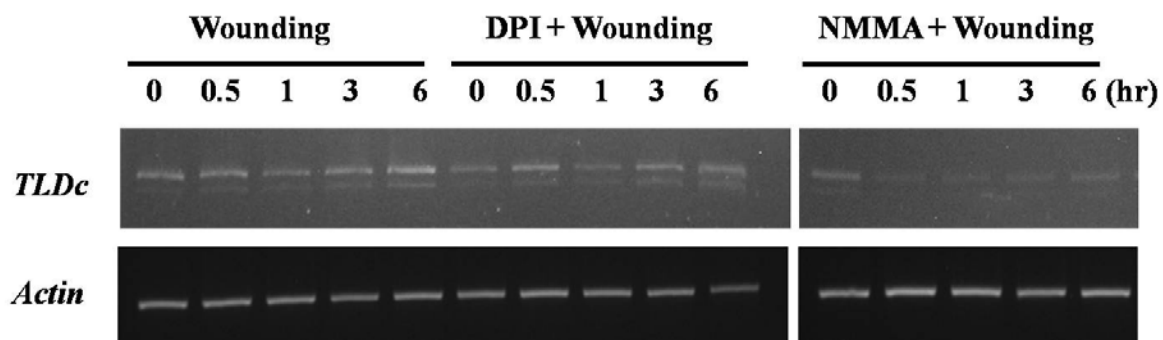


圖十三、甘藷 *RPK* (*receptor protein kinase*) 基因表現分析。

挑選完全展開的甘藷葉片，由葉柄剪下後浸泡於水中 12 小時，再換水、 $H_2O_2$  抑制劑 DPI 或 NO 抑制劑 NMMA 浸泡 12 小時，樣品處理前再次更換水或抑制劑，並以鑷子攝傷葉片，並以只浸泡水或抑制劑的葉片作為控制組材料，收取處理 0.5、1、3、6 小時的不同時間點葉片，抽取 RNA 進行 RT-PCR 分析，分析 *RPK* 基因的表現情形。使用表一 RT-PCR 引子，其為 miR828 target site 兩側。(n=3)

$H_2O_2$  抑制劑為 100  $\mu$ M diphenylene iodonium (DPI)。

NO 抑制劑為 500  $\mu$ M  $N^G$ -monomethyl L-Arginine monoacetate (NMMA)。



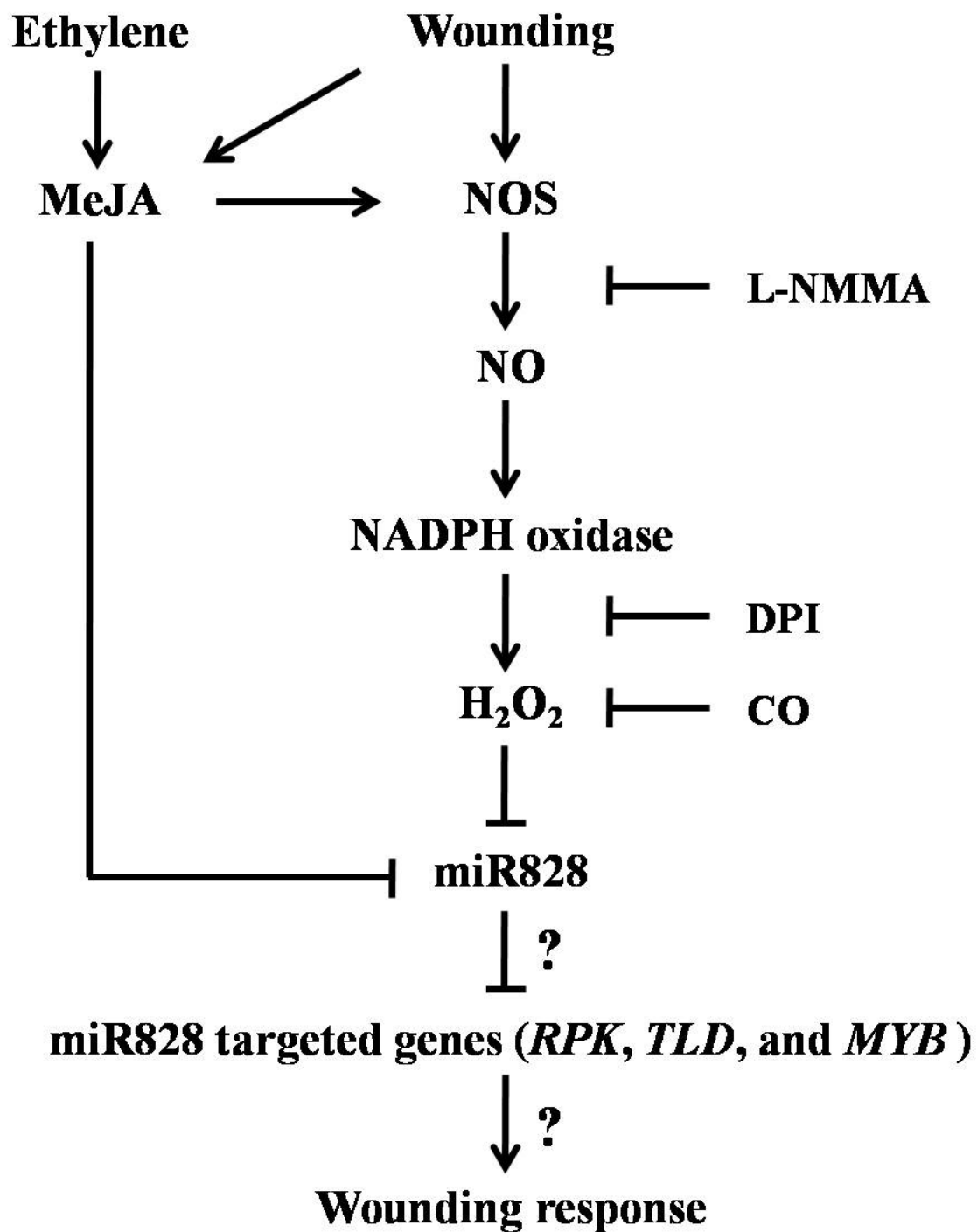
圖十四、甘藷 *TLD* 基因表現分析。

挑選完全展開的甘藷葉片，由葉柄剪下後浸泡於水中 12 小時，再換水、 $H_2O_2$  抑制劑 DPI 或 NO 抑制劑 NMMA 浸泡 12 小時，樣品處理前再次更換水或抑制劑，並以鑷子攝傷葉片，並以只浸泡水或抑制劑的葉片作為控制組材料，收取處理 0.5、1、3、6 小時的不同時間點葉片，抽取 RNA 進行 RT-PCR 分析，分析 *TLD* 基因的表現情形。使用表一 RT-PCR 引子，其為 miR828 target site 兩側。(n=2)

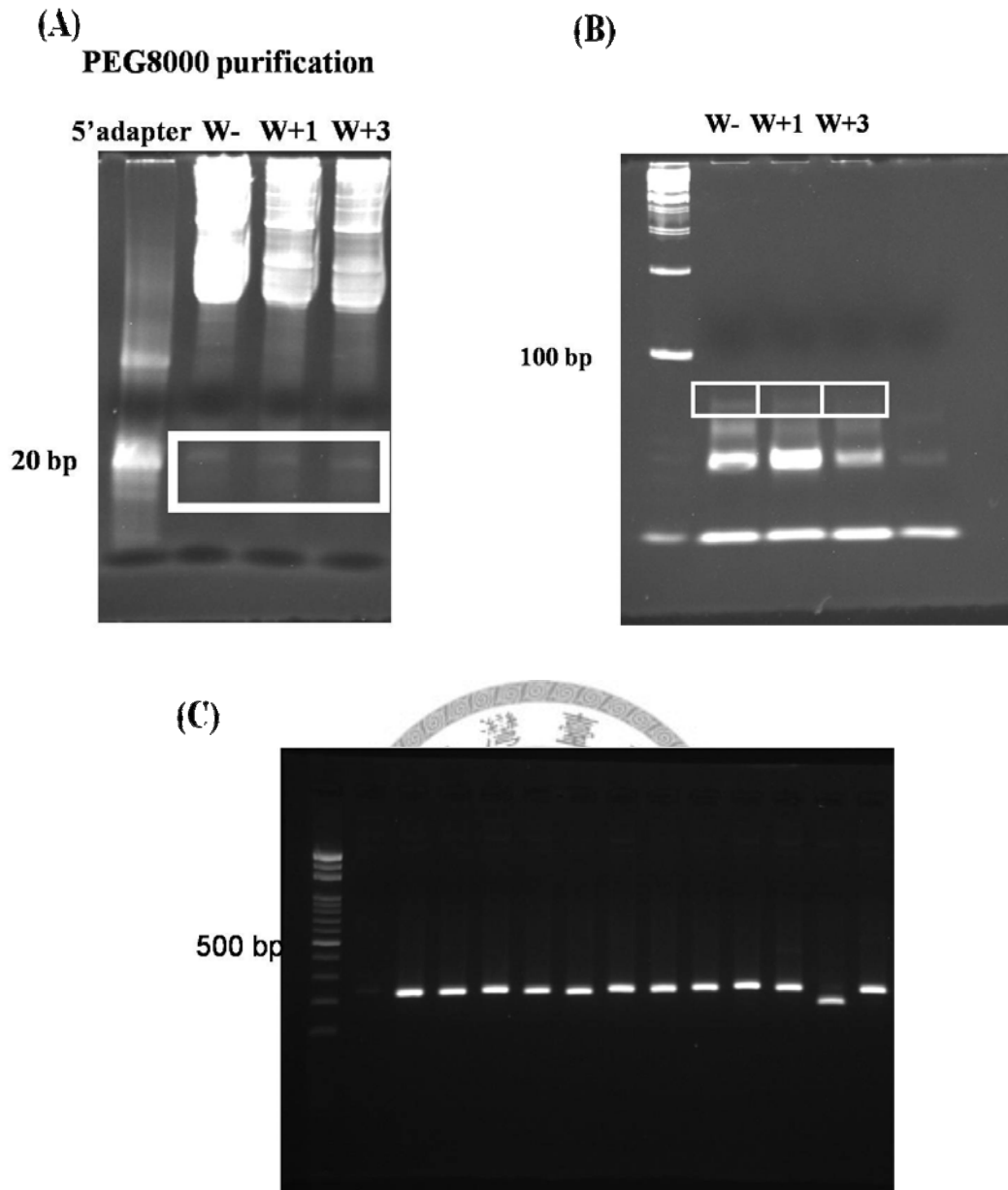
$H_2O_2$  抑制劑為 100  $\mu M$  diphenylene iodonium (DPI)。

NO 抑制劑為 500  $\mu M$   $N^G$ -monomethyl L-Arginine monoacetate (NMMA)。





圖十五、miR828 訊息傳遞路徑圖。



圖十六、miRNA 克隆(clone)

(A)分離 20-30 nts 的小片段 RNA 之電泳圖。

(B)小片段 RNA 的 RT-PCR 之電泳圖。

(C)以 M13 引子進行 PCR 反應確認構築小片段 RNA 載體之電泳圖。

## 參考文獻

**Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A.M., and Carrington, J.C.** (2005). microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* **121**: 207-221.

**Alvarez, M.E., Pennell, R.I., Meijer, P.J., Ishikawa, A., Dixon, R.A., and Lamb, C.** (1998). Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* **92**: 773-784.

**Apostol, I., Heinstejn, P.F., and Low, P.S.** (1989). Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. Role in defense and signal transduction. *Plant Physiol.* **90**: 106-116.

**Aukerman, M.J., and Sakai, H.** (2003). Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes. *Plant Cell* **15**: 2730-2741.

**Axtell, M.J., Snyder, J.A., and Bartel, D.P.** (2007). Common functions for diverse small RNAs of land plants. *Plant Cell* **19**: 1750-1769.

**Bartel, B.** (2005). MicroRNAs directing siRNA biogenesis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**: 569-571.

**Bartel, D.P.** (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**: 281-297.

**Bergey, D.R., Howe, G.A., and Ryan, C.A.** (1996). Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals. *Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA **93**: 12053-12058.

**Bergey, D.R., and Ryan, C.A.** (1999). Wound- and systemin-inducible calmodulin gene expression in tomato leaves. *Plant Mol. Biol.* **40**: 815-823.

**Birkenmeier, G.F., and Ryan, C.A.** (1998). Wound signaling in tomato plants. Evidence that aba is not a primary signal for defense gene activation. *Plant Physiol.* **117**: 687-693.

**Carrington, J.C., and Ambros, V.** (2003). Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* **301**: 336-338.

**Chen, X.** (2004). A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. *Science* **303**: 2022-2025.

**Chiou, T.J., Aung, K., Lin, S.I., Wu, C.C., Chiang, S.F., and Su, C.L.** (2006). Regulation of phosphate homeostasis by MicroRNA in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**: 412-421.

**Combier, J.P., Frugier, F., de Billy, F., Boualem, A., El-Yahyaoui, F., Moreau, S., Vernié, T., Ott, T., Gamas, P., Crespi, M., and Niebel, A.** (2006). MtHAP2-1 is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula*. *Genes Dev.* **20**: 3084-3088.

**Creelman, R.A., and Mullet, J.E.** (1995). Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 4114-4119.

**Dekker, J., and Hargrove, M.** (2002). Weedy adaptation in *Setaria* spp. V. Effects of

gaseous environment on giant foxtail (*Setaria faberii*) (Poaceae) seed germination. *Am. J. Bot.* **89**: 410-416.

**Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A., and Lamb, C.** (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**: 585-588.

**Doench, J.G., and Sharp, P.A.** (2004). Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev.* **18**: 504-511.

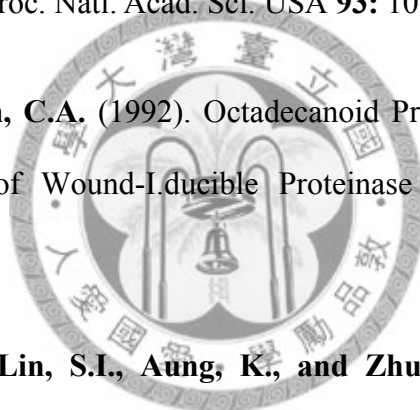
**Enslin, H., Tokumitsu, H., Stork, P.J.S., Davis, R.J., and Soderling, T.R.** (1996). Regulation of mitogen-activated protein kinases by a calcium/calmodulin-dependent proteins kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 10803-10808.

**Farmer, E.E., and Ryan, C.A.** (1992). Octadecanoid Precursors of Jasmonic Acid Activate the Synthesis of Wound-Inducible Proteinase Inhibitors. *Plant Cell* **4**: 129-134.

**Fujii, H., Chiou, T.J., Lin, S.I., Aung, K., and Zhu, J.K.** (2005). A miRNA involved in phosphate-starvation response in Arabidopsis. *Curr. Biol.* **15**: 2038-2043.

**Hammond, S.C., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G.J.** (2000). An RNA-directed nuclease mediates posttranscriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**: 293-296.

**Han, Y., Zhang, J., Chen, X., Gao, Z., Xuan, W., Xu, S., Ding, X., and Shen, W.** (2008). Carbon monoxide alleviates cadmium-induced oxidative damage by modulating glutathione metabolism in the roots of *Medicago sativa*. *New Phytol.* **177**: 155-166.



**Jih, P.J., Chen, Y.C., and Jeng, S.T.** (2003). Involvement of hydrogen peroxide and nitric oxide in expression of the ipomoelin gene from sweet potato. *Plant Physiol.* **132**: 381-389.

**Kandath, P.K., Ranf, S., Pancholi, S.S., Jayanty, S., Walla, M.D., Miller, W., Howe, G.A., Lincoln, D.E., and Stratmann, J.W.** (2007). Tomato MAPKs LeMPK1, LeMPK2, and LeMPK3 function in the systemin-mediated defense response against herbivorous insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 12205-12210.

**Kende, H.** (1993). Ethylene biosynthesis. *Annu. Rev. plant physiol.* **44**: 283-307.

**Knight, H., Trewavas, A.J., and Knight, M.R.** (1996). Cold calcium signaling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *Plant Cell* **8**: 489-503.

**Knight, M.R., Smith, S.M., and Trewavas, A.J.** (1992). Wind-induced plant motion immediately increases cytosolic calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 4967-4971.

**Kolomiets, M.V., Hannapel, D.J., Chen, H., Tymeson, M., and Gladon, R.J.** (2001). Lipoxygenase is involved in the control of potato tuber development. *Plant Cell* **13**: 613-626.

**Kurihara, Y., and Watanabe, Y.** (2004). *Arabidopsis* micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**: 12753-12758.

**Lamb, C., and Dixon, R.A.** (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Bio.* **48**: 251-275.

**Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H., and Kim, V.N.** (2004).

MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* **23**: 4051-4060.

**Lincoln, J.E., Campbell, A.D., Oetiker, J., Rottmann, W.H., Oeller, P.W., Shen, N.F., and Theologis, A.** (1993). LE-ACS4, a fruit ripening and wound-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene of tomato (*Lycopersicon esculentum*). Expression in *Escherichia coli*, structural characterization, expression characteristics, and phylogenetic analysis. *J. Biol. Chem.* **268**: 19422-19430.

**Liu, K., Xu, S., Xuan, W., Ling, T., Cao, Z., Huang, B., Sun, Y., Fang, L., Liu, Z., Zhao, N., and Shen, W.** (2007). Carbon monoxide counteracts the inhibition of seed germination and alleviates oxidative damage caused by salt stress in *Oryza sativa*. *Plant Sci.* **172**: 544-555.

**Lu, C., Meyers, B.C., and Green, P.J.** (2007). Construction of small RNA cDNA libraries for deep sequencing. *Methods* **43**:110-117.

**Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., and Kutay, U.** (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science* **303**: 95-98.

**Mallory, A.C., Reinhart, B.J., Jones-Rhoades, M.W., Tang, G., Zamore, P.D., Barton, M.K., and Bartel, D.P.** (2004). MicroRNA control of PHABULOSA in leaf development: importance of pairing to the microRNA 5' region. *EMBO J.* **23**: 3356-3364.

**Mallory, A.C., Bartel, D.P., Bartel, B.** (2005). MicroRNA-directed regulation of *Arabidopsis* AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *Plant Cell.* **17**: 1360-1375.

**Memelink, J., Verpoorte, R., and Kijne, J.W.** (2001). Organization of

jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. *Trends in Plant Science* **6**: 212-219.

**Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Luhrmann, R., and Tuschl, T.** (2002). Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* **110**: 563-574.

**Muramoto, T., Tsurui, N., Terry, M.J., Yokota, A., and Kohchi, T.** (2002). Expression and biochemical properties of a ferredoxin-dependent heme oxygenase required for phytochrome chromophore synthesis. *Plant Physiol.* **130**: 1958-1966.

**Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O., and Jones, J.D.** (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science*. **312**: 436-439.

**Noriega, G.O., Balestrasse, K.B., Batlle, A.M.C., and Tomaro, M.L.** (2004). Heme oxygenase exerts a protective role against oxidative stress in soybean leaves. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **3223**: 1003-1008.

**O'Donnell, P.J., Calvert, C., Atzorn, R., Wasternack, C., Leyser, H.M.O., and Bowles, D.J.** (1996). Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science* **274**: 1914-1917.

**Olson DC, White JA, Edelman L, Harkins RN, and Kende H.** (1991). Differential expression of two genes for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato fruits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 5340-5344.

**Orozco-Cárdenas, M.L., and Ryan, C.A.** (1999). Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway.



Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**: 6553-6557.

**Park, M.Y., Wu, G., Gonzalez-Sulser, A., Vaucheret, H., and Poethig, R.S.** (2005). Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **102**: 3691-3696.

**Peña-Cortés, H., Fisahn, J., and Willmitzer, L.** (1995). Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**: 4106-4113.

**Qui, Z.-H., Gijon, M.A., de Carvalho, M.S., Spencer, D.M., and Leslie, C.C.** (1998) The role of calcium and phosphorylation of cytosolic phospholipase A2 in regulating arachidonic acid release in macrophages. J. Biol. Chem. **273**: 8203-8211.

**Rajagopalan, R., Vaucheret, H., Trejo, J., and Bartel, D.P.** (2006). A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in Arabidopsis thaliana. Genes Dev. **20**: 3407-3425.

**Reinbothe, S., Mollenhauer, B., and Reinbothe, C.** (1994). JIPs and RIPs: the regulation of plant gene expression by jasmonates in response to environmental cues and pathogens. Plant Cell **6**: 1197-1209.

**Rhoades, M.W., Reinhart, B.J., Lim, L.P., Burge, C.B., Bartel, B., and Bartel, D.P.** (2002). Prediction of plant microRNA targets. Cell **110**: 513-520.

**Reyes, J.L., and Chua, N.H.** (2007). ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination. Plant J. **49**: 592-606.

**Ryan, C.A.** (2000). The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1477**: 112-121.

**Reymond, P., Weber, H., Damond, M., and Farmer, E.E.** (2000). Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**: 707-720.

**Schaller, F.** (2001). Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signalling molecules. *J. Exp. Bot.* **52**: 11-23.

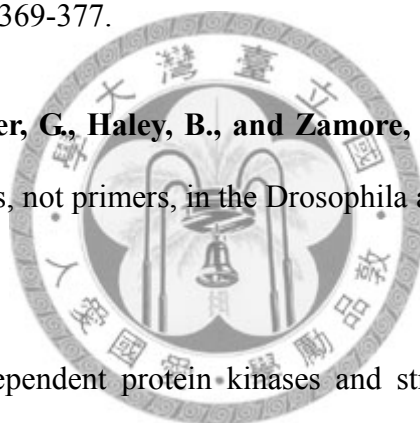
**Schilmiller, A.L., and Howe, G.A.** (2005). Systemic signaling in the wound response. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**: 369-377.

**Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Haley, B., and Zamore, P.D.** (2002). Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the *Drosophila* and human RNAi pathways. *Mol. Cell* **10**: 537-548.

**Sheen, J.** (1996) Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinases and stress signal transduction in plants. *Science* **274**: 1900-1902.

**Shiu, O.Y., Oetiker, J.H., Yip, W.K., and Yang, S.F.** (1989). The promoter of LE-ACS7, an early flooding-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene of the tomato, is tagged by a Sol3 transposon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 10334-10339.

**Song, X.G., She, X.P., and Zhang, B.** (2008). Carbon monoxide-induced stomatal closure in *Vicia faba* is dependent on nitric oxide synthesis. *Physiol. Plant* **132**: 514-525.



**Sunkar, R., Chinnusamy, V., Zhu, J., and Zhu, J.K.** (2007). Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends Plant Sci.* **12**: 301-309.

**Sunkar, R., Kapoor, A., and Zhu, J.K.** (2006). Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in Arabidopsis is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *Plant Cell* **18**: 2051-2065.

**Sunkar, R., and Zhu, J.K.** (2004). Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 2001-2019.

**Talmor-Neiman, M., Stav, R., Klipcan, L., Buxdorf, K., Baulcombe, D.C., and Arazi, T.** (2006). Identification of trans-acting siRNAs in moss and an RNA-dependent RNA polymerase required for their biogenesis. *Plant J.* **48**: 511-521.

**Tang, G., Reinhart, B.J., Bartel, D.P., and Zamore, P.D.** (2003). A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev.* **17**: 49-63.

**Tsuji, H., Aya, K., Ueguchi-Tanaka, M., Shimada, Y., Nakazono, M., Watanabe, R., Nishizawa, N.K., Gomi, K., Shimada, A., Kitano, H., Ashikari, M., and Matsuoka, M.** (2006). GAMYB controls different sets of genes and is differentially regulated by microRNA in aleurone cells and anthers. *Plant J.* **47**: 427-444.

**Vaucheret, H., Vazquez, F., Crete, P., Bartel, D.P.** (2004). The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes Dev.* **18**: 1187-1197.

**Walling, L.L.** (2000). The myriad plant responses to herbivores. *J. Plant Growth Regul.* **19**: 195-216.

**Watanabe, T., and Sakai, S.** (1998). Effects of active oxygen species and methyl jasmonate on expression of the gene for a woundinducible 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in winter squash (*Cucurbita maxima*). *Planta* **206**: 570-576.

**Wendehenne, D., Durner, J., and Klessig, D.F.** (2004). Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 449-455.

**Wu, M.F., Tian, Q., and Reed, J.W.** (2006). Arabidopsis microRNA167 controls patterns of ARF6 and ARF8 expression, and regulates both female and male reproduction. *Development.* **133**: 4211-4218.

**Xie, Y., Ling, T., Han, Y., Liu, K., Zheng, Q., Huang, L., Yuan, X., He, Z., Hu, B., Fang, L., Shen, Z., Yang, Q., and Shen, W.** (2008). Carbon monoxide enhances salt tolerance by nitric oxide-mediated maintenance of ion homeostasis and up-regulation of antioxidant defense in wheat seedling roots. *Plant Cell Environ.* [Epub ahead of print]

**Xie, Z., Kasschau, K.D., Carrington, J.C.** (2003). Negative feedback regulation of Dicer-Like1 in Arabidopsis by microRNA-guided mRNA degradation. *Curr. Biol.* **13**: 784-789.

**Yang, J.H., Han, S.J., Yoon, E.K., and Lee, W.S.** (2006). Evidence of an auxin signal pathway, microRNA167-ARF8-GH3, and its response to exogenous auxin in cultured rice cells. *Nucleic Acids Res.* **34**: 1892-1899.

**Yan, K.S., Yan, S., Farooq, A., Han, A., Zeng, L., and Zhou, M.M.** (2003). Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature* **426**: 468-474.

**Yoo, B.C., Kragler, F., Varkonyi-Gasic, E., Haywood, V., Archer-Evans, S., Lee, Y.M., Lough, T.J., and Lucas, W.J.** (2004). A systemic small RNA signaling system in plants. *Plant Cell* **16**: 1979-2000.

**Yu, B., Yang, Z., Li, J., Minakhina, S., Yang, M., Padgett, R.W., Steward, R., and Chen, X.** (2005). Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science* **307**: 932-935.

**Zeng, Y., and Cullen, B.R.** (2004). Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res.* **32**: 4776-4785.

