

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

控制水稻內外穎發育基因之研究(3/3) 研究成果報告(完整版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 95-2313-B-002-009-
執行期間：95年08月01日至96年07月31日
執行單位：國立臺灣大學農藝學系暨研究所

計畫主持人：劉麗飛

計畫參與人員：此計畫無參與人員：無

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 96年12月21日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 ■ 成果報告

控制水稻內外穎發育基因之研究 (3/3)

計畫類別：■ 個別型計畫 □ 整合型計畫

計畫編號：NSC 95—2313—B—002—009—95C—7210

執行期間： 95 年 8 月 1 日 至 96 年 7 月 31 日

計畫主持人：劉麗飛

共同主持人：

計畫參與人員：

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)：□ 精簡報告 ■ 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

□ 涉及專利或其他智慧財產權，□ 一年 □ 二年後可公開查詢

執行單位：國立台灣大學農藝系

中 華 民 國 96 年 12 月 21 日

摘要

水稻是世界上最重要的糧食作物之一，水稻穎花大小決定穀粒發育，進而影響水稻產量。本試驗目的擬探討水稻穎花發育相關基因。以農試所王強生博士團隊利用疊氮化鈉誘變品系後代中，篩選到小穎花突變體(*SLP/slp*, stunted lemma and palea)為材料，進行生長性狀調查及基因表現差異篩選，期可分離出穎花發育相關基因。本計畫第一年進行基因表現差異篩選，取 *SLP* 與 *slp* 突變體 1~4 公分幼花序，利用 cDNA-AFLP 方法，再經由 reverse northern blotting assay 確認，共計獲得 66 個 cDNA clones，定序後得到 57 筆完整定序資料，已知基因片段共 34 個，分屬 27 種基因，為穎花發育相關之候選基因。第二年乃挑選 6 個基因：*salT* 基因 (salt-induced protein)、*GA-SPY* 基因 (gibberellin action negative regulator SPY-related protein)、*U2AF* 基因 (U2 snRNP auxiliary factor, small subunit -related protein)、*kinesin-like* 基因、*DnaJ-like* 基因、及 *EF hand* 基因，利用 Real-Time RT-PCR 分析，發現 *salT* 基因在突變體幼花序中大量表現。因此，進一步分析 *salT* 基因在水稻不同器官中的表現，發現 *salT* 基因在水稻中僅有一個拷貝數，葉鞘 *salT* 基因表現量比葉身高，在 *SLP/SLP* 幼花序中幾乎不表現，但在 *slp/slp* 幼花序中表現量極高，因此進一步進行基因轉殖，將 *salT* 基因大量表現或抑制表現，但是觀察轉植株性狀，發現除了水稻 TNG67 之 *p1USN* 轉植株形態類似 *slp* 突變體外，其他不論促進或抑制 *salT* 基因表現的 To 代轉植株，均無穎花大小及型態改變，與試驗的假設不符合，無法證明 *salT* 基因對穎花內外穎發育的影響。

關鍵詞：水稻、穎花發育、穎花相關基因

Abstract

The size and shape of lemma and palea may limit the developing of rice grains, that could affect the rice yield indirectly. Therefore it is interesting to clone genes related to lemma and palea. In this study, six genes from the lemma/palea related gene pool which is established un the first year of this project were further studied. Those genes are *salT* gene (salt-induced protein), *GA-SPY* gene (gibberellin action negative regulator SPY-related protein), *U2AF* gene (U2 snRNP auxiliary factor, small subunit-related protein), *kinesin-like* gene, *DnaJ-like* gene, and *EF hand* gene. At first, the gene expression in leaves and 1~4 cm inflorescences of normal

lemma/palea (*SLP/SLP*), smaller lemma/palea (*SLP/slp*), and stunted lemma/palea (*slp/slp*) was compared by Real Time RT-PCR. The results showed that *salT* expression is higher in leaf sheath than in leaf lamina, and is especially high in the inflorescence of *slp/slp* mutant. The Southern blot showed that only one copy of *salT* gene in rice genome.

Key words : Rice, lemma and palea, lemma/palea related gene

前言

世界人口持續增加，一般估計到 2030 年全球人口可能會增加一倍，因此糧食生產及供應勢必日益不足。水稻是世界上最重要的糧食作物之一，在水稻植株性狀中，穀粒大小與充實度是構成產量的最直接因素，穀粒大小則受到穎花內、外穎構造的影響。已知現有的水稻種源中就有各種大小穀粒及穎花形態與構造的變異，但是大多數都還沒有選殖到相關的基因。農委會農業試驗所王強生博士領導的研究團隊，利用疊氮化鈉針對台農 67 號水稻品種進行誘變處理，經多代自交純化建立水稻突變庫 (mutation pool) (曾等, 2003)，其中出現一個小穎花

突變體(*SLP/slp*)，其自交後代中則出現了內、外穎皆退化的突變體(*slp*)，

是以前未曾發現的珍貴材料。因此本試驗希望能藉由這些突變體的研究，分離出相關的基因，並探討對穎花發育調控的影響，期望未來可以應用於水稻穎花構造的改良。本計畫試驗流程示於圖 1，在第一年進行基因表現差異篩選，取 *SLP* 與 *slp* 突變體 1~4 公分幼花序，利用 cDNA-AFLP 方法篩選出 335 個差異表現的 cDNA 片段，經由 reverse northern blotting assay 確認獲得 66 個 cDNA clones，定序後得到 57 筆完整定序資料，已知基因片段共 34 個，分屬 27 種基因，為穎花發育相關之候選基因。第二年乃挑選其中 6 個基因：*salt* 基因 (salt-induced protein)、*GA-SPY* 基因 (gibberellin action negative regulator SPY-related protein)、*U2AF* 基因 (U2 snRNP auxiliary factor, small subunit-related protein)、*kinesin-like* 基因、*DnaJ-like* 基因、及 *EF hand* 基因，進一步探討其與穎花發育關係。第三年進行基因轉殖，將 *salt* 基因大量表現或抑制表現，觀察轉殖水稻植株性狀的改變。

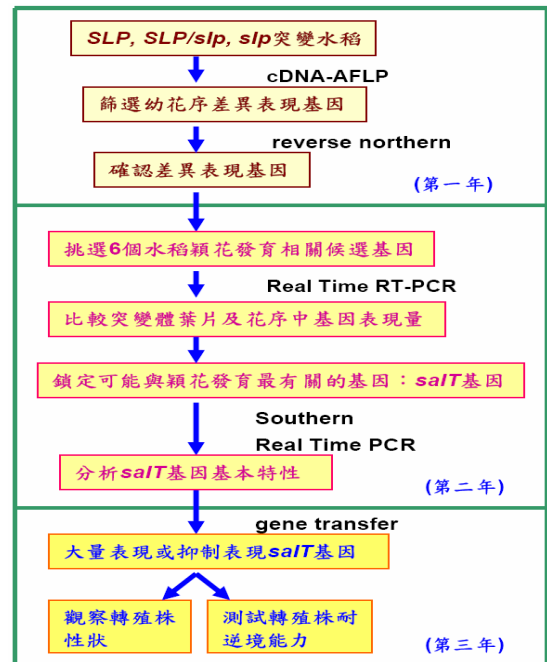


圖 1. 本計畫試驗流程

研究目的

本試驗目的擬探討水稻穎花發育相關基因。以農試所王強生博士團隊利用疊氮化鈉誘變品系後代中，篩選到小穎花突變體(*SLP/slp*, stunted lemma and palea)為材料，進行生長性狀調查及基因表現差異篩選，期可分離出穎花發育相關基因。

文獻探討

在水稻穎花研究方面，現有的水稻種原中已有各種大小穀粒及穎花型態的變異，但大多數僅定位基因在染色體上的位置，而未選殖出相關的基因(Oryzabase 網站)，如：造成水稻缺乏內穎的突變基因 *pal1* 便是座落在第六條染色體上(Luo et al., 2005)。水稻內外穎發育相關基因的研究上，大多針對穎花內外穎數目增減或型態的變異進行研究，如：*OsMADS1* 基因會調控水稻內外穎的形狀(Joen et al., 2000；Prasad et al., 2001)，*OsFOR1* 基因則可調控內穎或外穎的數目(Jang et al., 2003)，對於穎花發育不完全或內外穎變小之研究較少。農委會農業試驗所王強生博士領導的團隊，對水稻台農 67 號品種進行疊氮化鈉誘變處理(曾等, 2003)，在後代品系中出現一小穎花突變體(*SLP/slp*, stunted lemma and palea)，此為極珍貴的材料。劉(2003)首先以該突變體為材料，利用 cDNA-AFLP 方法找出一群穎花發育相關的候選基因，本試驗自該基因庫挑選出六個有興趣的目標基因繼續進行分析，希望可以找出與穎花發育相關的基因，期可應用在穎花構造的改良上。

材料與方法

材料

水稻 *SLP/slp* 穎花突變體源於行政院農委會農業試驗所農藝組，由王強生博士及曾東海先生提供，以疊氮化鈉處理水稻台農 67 號(TNG67)，所得誘變材料經自交數代後篩選獲得 TM6 品系；TM6 品系再與台梗二號(TK2)雜交，後代經自交五代分離得到 *SLP/slp* 小穎花突變體。*SLP/slp* 突變體自交後代會分離出正常型穎花(*SLP*)、小穎花突變體(*SLP/slp*)及內外穎退化突變體(*slp*)。

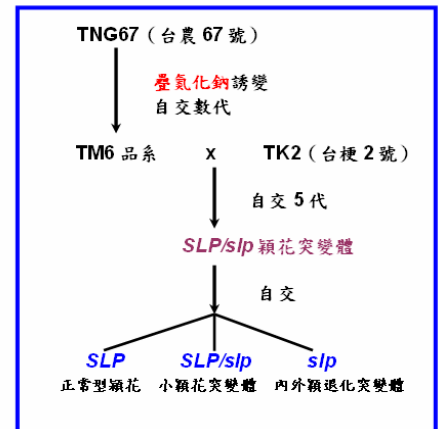


圖 2. 本計畫試驗材料

方法

一、水稻穎花突變體形態及性狀調查

包括：分離後代植株形態觀察、組織切片觀察和農藝性狀及分離率調查。

二、水稻穎花突變體基因表現差異篩選

1. **cDNA-AFLP 法**：以正常型穎花(*SLP*)及內外穎退化突變體(*slp*)1~4 cm 花序，進行 cDNA-AFLP 分析，以篩選出表現差異的 cDNA 片段。參考 Gibco BRL 之 AFLP™ Analysis System。

主要包括四個步驟：(1) cDNA 的合成，

- (2) 限制酵素降解處理及接合子的連接，
- (3) PCR 初步擴增含接合子的 cDNA 模板，
- (4) PCR 擴增有差異表現的 cDNA 片段。
- (5) 聚丙醯胺膠體電泳分析。

2. **Reverse Northern 法**：確認並篩選正常型穎花 (*SLP*) 及內外穎退化突變體 (*slp*)中表現差異的 cDNA 片段。

3. 差異表現 cDNA 片段選殖、定序及比對。

三、水稻穎花相關基因表現分析

本試驗由第一年所建立水稻穎花發育相關候選基因，依據差異片段表現的強度及該基因的研究近況，挑選出六個有興趣的目標基因：*salT* 基因、*GASPY* 基因、*U2AF* 基因、*Kinesin-like* 基因、*DnaJ-like* 基因、及 *EF-hand* 基因，分別設計引子(表1)，利用 Real-Time RT-PCR 分析不同基因在 *SLP/SLP*、*SLP/slp* 與 *slp/slp* 突變體葉片及幼花序中表現之差異。

表1. 水稻穎花發育相關基因片段之引子設計。

基因名稱	引子名稱	引子序列 (5' → 3')	預期擴增cDNA 片段(bp)
<i>salT</i>	5' <i>salT</i>	TACGGATCCATGAGGCTGGTGAAGATTGG	438
	3' <i>salT</i>	TCATCTAGACTCGAGTCAAGGGTGGACGTAGATGCC	
<i>GASPY</i>	5' GA-SPY	TACAGACAAGCAATCCCAGTTAACAGCGC	257
	3' GA-SPY	TCAGTAGGCCTGCAAAGCGTCGAATTCT	
<i>U2AF</i>	5' U2AF	TACTGCAAGGAGCCCAGTCAGGGAAA	234
	3' U2AF	TCACCTGCATTTAAAAGGGTTACTCAGCC	
<i>Kinesin</i>	5' Kinesin	TACCAGATCAAAAAGATGATGTCCGGG	300
	3' Kinesin	TCAAGAGAGGAAATCACATTAACGCCAC	
<i>DnaJ-like</i>	5' DnaJ-like	TACCCTGATACAGTGACAGGAGAC	382
	3' DnaJ-like	TCACCTGACAATTGATTCTGGGTCTGTGG	
<i>EF-hand</i>	5' EF-hand	TACCTCCATGGTGATAACCTGGAGCAACC	323
	3' EF-hand	TCATCTACCTGTTCAACAGCTCC	
<i>G3PDH</i>	5' G3PDH	CCGTTGATGGACCGTCCAGC	384
	3' G3PDH	GAGCCATTCCAGCCTTGCGC	

四、水稻 *salT* 基因表現分析

本試驗進一步鎖定*salT* 基因，探討*salT* 基因是否與水稻穎花發育有關。

1. 水稻內生*salT* 基因拷貝數

選擇*salT* 基因組序列中，沒有切位的酵素*BamHI*及*EcoRV*，及一個切位的酵素*PstI*，酶切水稻台農67號品種、SLP/SLP、SLP/slp及slp/slp突變體基因組DNA，以Dig-labeled *salT* coding region 序列，進行南方氏墨點分析，了解基因組DNA中所含*salT*基因的拷貝數。

2. 水稻*salT*基因表現

利用Real-Time RT-PCR，分析*salT* 基因在三種突變體基因組中的特性、表現時期及部位等。

五、*salT*基因轉殖水稻

1. *salT* 基因構築：構築 *salT* 基因大量表現或抑制表現的質體。
2. *salT* 基因轉殖水稻：利用農桿菌法進行水稻基因轉殖。
3. *salT* 轉殖水稻農藝性狀調查：觀察轉殖水稻植株性狀的改變。

結果與討論

一、水稻穎花突變體形態及性狀調查

1. 突變體植株形態觀察

觀察水稻小穎花突變體(*SLP/slp*)自交後代分離族群，可分為正常型穎花(*SLP*)、小穎花突變體(*SLP/slp*)及內外穎退化突變體(*slp*)三種 (圖 3)。

觀察 *SLP/slp* 突變體自交後代分離族群，營養生長初期三種外表型間差異並不明顯，但到營養生長後期，植株高度漸增時，可以觀察到有差異，植株外觀上 *SLP* 正常型株高平均 121cm，與其來源親本台農 67 號相似，沒有異常表現，*SLP/slp* 突變體株高平均 115cm，與 *SLP* 正常型株高相近，但 *SLP/slp* 突變體葉片較挺直；*slp* 突變體則略矮，株高平均 77cm，比正常型矮約 36%，葉片顏色較為深綠、組織較脆較缺乏彈性，劍葉之葉身與葉鞘間常發生扭曲影響抽穗。分析三種外表型株高組成，發現 *slp* 突變體之穗長平均 13cm、第一節間平均 17cm 及第二節間平均 10cm，長度上明顯都較 *SLP* 正常型及 *SLP/slp* 突變體之相同部位短 6~12cm，是造成 *slp* 突變體矮小的主要原因 (表 2)。

因為 *slp* 突變體植株完全不稔，所以只調查 *SLP* 正常型及 *SLP/slp* 突變體部分農藝性狀，顯示 *SLP/slp* 突變體平均穗數為 26 穗，比 *SLP* 正常型之 17 穗多；每穗穎花密度(7 穎花/cm)與 *SLP* 正常型相當；稔實率 7%及千粒重 7g，則遠低於 *SLP* 正常型稔實率 56%及千粒重 24g (表 3)。

植株開花後則可直接依照穎花型態加以區分。*SLP* 正常型的穎花形態及大小與一般梗稻相同，長度約 0.8cm；*SLP/slp* 突變體穎花則較小，長度約 0.5cm，稔實率較低，平均 7%；*slp* 突變體穎花最小，長度僅約 0.2cm，而且不稔，觀察穎花內花器結構，三者均沒有變化，亦即均保持水稻穎花基本結構：一對護穎、一個外穎、一個內穎、一對鱗被、六個雄蕊、一個雌蕊。但三者之內穎、外穎、雄蕊及雌蕊在發育的程度上有所差別。(圖 4)

2. 突變體後代分離率調查

將水稻穎花 *SLP/slp* 突變體自交後代種植在臺大農場，調查後代分離族群中三種穎花外表型分離情形，並進行簡單的 χ^2 分析，結果顯示在調查的 68 株分離後代中 *SLPSLP* : *SLPslp* : *slpslp* = 15:35:18 ($\chi^2=0.324$, $P=0.851$)，符合孟德爾單基因自交後代分離比 1:2:1 的模式(表 4)。推測影響穎花發育之突變基因為單一隱性之遺傳性狀。

3. 突變體組織切片觀察

可觀察到 *SLP* 正常型穎花的內、外穎組成由外到內有：外側表皮厚壁細胞、皮下厚壁細胞、柔組織層薄壁細胞及內側表皮細胞四層構造，其後壁細胞均有明顯木質素的累積，外側表皮以外因二次細胞壁不均勻增厚，形成凹凸不平的粗糙結構，呈現明顯木質素反應(圖 5A)。*SLP/slp* 突變體大致上保留四層細胞構造，但木質化程度較弱，外側表皮變大，有明顯空腔構造，表皮以外則沒有凹凸不平的粗糙結構(圖 5B)。而 *slp* 突變體仍可看到未發育的內、外穎，仍有四層細胞構造，但各層細胞分化不完全 (圖 5C)。

二、水稻穎花突變體基因表現差異篩選

1. cDNA-AFLP 及 Reverse Northern 篩選結果：

以 *SLP* 正常型與 *slp* 突變體 1~4cm 長的幼花序為材料進行 cDNA-AFLP，使用 Gibco BRL 之 AFLPTM Analysis System I 及 System II 共 128 個篩選引子組合進行聚丙醯胺膠體電泳分析，篩選具差異性表現之 cDNA 片段(圖 6)。發現 *SLP* 正常型中表現增強的 cDNA 片段有 164 個；*slp* 突變體中表現增強的 cDNA 片段有 171 個，總和 335 個具有差異表現的 cDNA 片段。配合反向 reverse northern blotting assay 再進一步篩選確認 *SLP* 正常型與 *slp* 突變體間表現有差異之 cDNA 片段，由 335 個 cDNA 片段中篩選出約 102 個 cDNA 片段，而且大部份均顯示在 *slp* 突變體 1~4cm 花序內有較強的表現(圖 7)。

2. 差異表現 cDNA 片段選殖：

差異表現 cDNA 片段的選殖優先選取 reverse northern blotting assay 中已確認具再現性差異表現明顯的 cDNA 片段，其次選取差異表現較不明顯或沒有反應的 cDNA 片段。目前由 52 個 cDNA 片段，共選殖得到 66 個 cDNA clones。

3. 選殖 cDNA 片段之定序及比對結果

將前述選殖到的 66 個 cDNA clones 送定序後，經扣除相同篩選引子得到之相同序列及定序不完整者，共計得到 57 筆完整的定序資料，分別來自於 47 個 cDNA-AFLP 片段。由 TIGR 網站 (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/osa1>) Sequence Search 的相關資料庫比對發現，不論是來自 *SLP* 正常型或 *slp* 突變體的 1~4cm 花序具差異表現性之 57 個 clones，其基因序列均存在於水稻的 BAC 或 PAC clones 上，而且大部分都對應到水稻基因的 coding sequence(表 5)。扣除上述第一群對照用之 II-2-c 及 I-14-c 外，其他 clones 定序後不均衡的散佈在水稻的 12 條染色體上。顯示，*slp* 突變體所影響的基因並非只有單一或少數，而是廣泛分散在水稻基因組內。

這些 reverse northern blotting assay 差異較顯著的 cDNA 片段相關 clones，經由資料庫比對搜尋所對應到之相關蛋白質包括：一部份的 salt-induced protein (II-24-1 等)、DnaJ-like protein (II-6-1)、microtubule-associated protein-like-related (I-35-2)、chromatin remodeling factor CHD3-related (I-42-2)、protein Kinase-like protein-related (II-7-1)、putative clathrin assembly protein (II-1-3)、putative protein kinase (II-6-2)、ribosomal protein S6e (II-1-4)等。在核酸序列之層次上都有高達 77%或以上的相似性。其他 reverse northern blotting assay 反應較弱，差異較不顯著的 cDNA 片段相關 clones，經資料庫比對其相關基因除部分與上述相同外，其他有趣的蛋白尚包括：putative retroelement-related (II-19-1b)、kinesin-like protein-related (II-2-1)、putative transposable element-related (II-21-2)、putative gag-pol polyprotein-related (II-36-4)等等(表 5)。

三、水稻穎花相關基因表現分析

分析第一年所建立水稻穎花發育相關候選基因庫，依據差異片段表現的強度及該基因在相關物種中的研究近況，挑選出六個有可能與穎花發育有關的基因進行分析，各基因及其所在色體分別為：salt-induced protein(*salt*)(chr.1)、gibberellin action negative regulator SPY-related protein(*GA-SPY*)(chr.8)、U2 snRNP auxiliary factor, small subunit-related protein(*U2AF*)(chr.5)、Kinesin-like protein (chr.4)、Dna-J-like protein (chr.2)、及 EF hand(chr.10)。從所選殖片段的定

序結果與原始序列比對到相似序列的附近區域，分別設計適當的引子序列，以*slp/slp* 突變體 1-4 公分幼花序為材料，進行RT-PCR 擴增後，可以獲得各基因專一片段：*salT*(438bp)(圖8)、*GA-SPY* (257bp) (圖9)、*U2AF* (234bp) (圖10)、*Kinesin-like* 基因(300bp) (圖11)、*DnaJ-like* 基因(382bp) (圖12)、及*EF hand* (323bp)片段(圖13)，經過定序及比對後確認為預期擴增片段序列(表1)。

進一步以*SLP/SLP*、*SLP/slp*、及*slp/slp* 突變體，劍葉葉片及1~10 公分幼花序為材料，利用Real Time RT-PCR 分析此六個基因組織表現的差異，以*G3PDH* 基因表現量進行標準後，可以獲得各基因的相對表現量(圖14)，依其表現趨勢分成四類：

(1) *salT* 基因：葉部表現低，在*slp/slp* 幼花序中大量表現，顯示可能與穎花器官的發育有關。分析*salT* 基因啟動子序列，含有：(1)*RVA1-A* 及*RAV1-B* motif，可供*RVA1* 蛋白質的AP2-like 及B3 區域結合(Kagaya *et al.*, 1999)，又阿拉伯芥中的AP2 基因屬於AE 模型中的A 基因(Ferrario *et al.*, 2004)。(2) *CArG* (MADS-domain protein binding element)保守序列，可供*AGL15* (*AGAMOUS-like 15*)及*FLC* (*FLOWER LOCUS C*)結合，*AGL15* 屬於MADS 蛋白質之一(Tang and Perry, 2003)，可能為阿拉伯芥AE 模型中之C 群基因(Ferrario *et al.*, 2004)；*FLC*與*CArG* 結合後，可以抑制*SOC1* 基因的作用，而影響開花時間。因此，*salT* 基因在幼花序表現的差異是否受上述啟動子特殊結合區域的調控，值得進一步探討。

(2) *Kinesin-like* 及*EF hand* 基因：在葉部大量表現，幼花序中表現低，且在三種突變體幼花序中，表現量並無太大差異，因此推測可能與*slp/slp* 穎花發育異常的關係不大。

(3) *GASPY* 及*U2AF* 基因：在葉部大量表現，且在*SLP/SLP* 正常型花中表現量較高，而在*slp/slp* 突變體幼花序中表現量較少，因此，亦可能與穎花發育有關。在植物發育過程中，*GA-SPY*基因被認為是GA 及Cytokinin 交互作用過程中的調控者(Wainberg *et al.*, 2005)，因此，是否*slp/slp* 突變體上游存在之突變基因調控*GA-SPY* 表現，影響GA 及Cytokinin 之交互作用，進而造成*slp/slp* 突變體性狀，尚須經實驗證實。

(4) *DnaJ-like* 基因：在葉部及幼花序表現量差異不大，且無專一表現，因此可能與*slp/slp* 突變體穎花發育中花器的決定無直接關係；不過，該基因在*SLP/SLP* 5-7公分幼花序中有較強的表現，可能表示：花器決定後需要大量*DnaJ-like*蛋白質表現，以支持後續細胞分化及花器發育，此部分推論尚須進一步證實。

四、水稻*salT* 基因表現特性分析

由於*salT* 基因在*slp/slp* 突變體幼花序中專一並大量表現，顯示*salT* 基因極可能與水稻穎花發育有關係。因此本試驗首先選擇*salT* 為目標基因，分析其在三種突變體基因組中的拷貝數、組織表現的差異，及在幼花序中的表現。

1. 水稻內生*salT* 基因拷貝數

利用南方氏墨點分析法，分析水稻台農67 號品種、*SLP/SLP*、*SLP/slp*、及*slp/slp* 突變體基因組中，內生*salT* 基因的拷貝數(圖15)。選用在*salT* DNA中無切位的限制酵素*BamHI* 及*EcoRV*，及一個切位的限制酵素*PstI* 進行酶切，進行探針雜合反應後，分別可獲得：*BamHI* (1 個條帶)、*EcoRV* (1 個條帶)及*PstI* (2 個條帶)，且各基因組所得到的條帶大小相同；因此認為在水稻基因組中*salT* 基因有1 個拷貝數，且*salT* 基因在不同突變體中表現量的差異，應與*salT* 基因存在的拷貝數無關。利用RT-PCR 擴增*SLP/SLP*、*SLP/slp*、及*slp/slp* 突變體coding region部份，進行定序分析，發現三者coding region 序列完全相同，顯示*salT* 基因的coding region 部份未發生變異。因此，*salT* 在不同突變體中表現量的差異可能是基因轉錄或後轉錄

過程中量的差異造成的。

2. 水稻 *salT* 基因之組織表現差異性

以 Real Time RT-PCR 比較不同突變體中，營養生長期和生殖生長期葉、葉鞘及幼花序 *salT* 基因表現的差異(圖16)。(1) 在三葉齡幼苗期：只有分析 SLP/SLP 品系，*salT* 基因表現量葉鞘最高，根次之，葉又次之。(2) 營養生長期：三種株型 *salT* 基因在葉片的表現量都很低，葉鞘的表現量則比在葉片高，但全都比 SLP/SLP 品系幼苗葉片低。(3) 生殖生長期：劍葉葉片中表現量仍很低，但在葉鞘有明顯增加。(4) 1-10公分幼花序：*salT* 基因在 SLP/SLP 品系中表現量低，但在 SLP/*slp* 及 *slp* 突變體中的表現量顯著高於其他組織的表現量，以 *slp/slp* 表現量高；以上結果顯示：*salT* 基因的表現除了有組織專一性外，也會依生長時期不同而改變。此結果與文獻報導相同(Claes *et al.*, 1990；Garcia *et al.*, 1998)。

3. 水稻 *salT* 基因在幼花序之表現

利用 Real Time RT-PCR 比較不同長度幼花序 *salT* 基因表現的差異(圖17)。在水稻 SLP/SLP 品系中，不同長度幼花序 *salT* 基因表現量均低，與劍葉葉片表現量差不多，在大於9公分的花序表現量才略提高1-2倍。在 SLP/*slp* 突變體中，*salT* 基因在1~2公分及3~4公分的幼花序有極高的表現，比 SLP/SLP 劍葉表現量高出30~34倍，而9~10公分及10公分以上表現量比 SLP/SLP 劍葉表現量高出4~5倍，也略比 SLP/SLP 正常型發育後期幼花序高1.9~2.7倍。在水稻 *slp* 突變體中，1~2公分、4~5公分、6~7公分及10公分以上的幼花序表現量最高，比 SLP/SLP 劍葉表現量高出24~34倍；其次在5~6公分、7~8公分、及9~10公分也有略高的表現量，比 SLP/SLP 劍葉表現量高4.3~6倍。總體而言，SLP/*slp* 突變體及 *slp/slp* 突變體大部分長度幼花序，*salT* 基因表現均比 SLP/SLP 正常型高。

salT 基因在突變穎花花序分化僅1-2公分時，即可觀察到其強表現，此時期為穎片分化期到花器官分化期，因此，*salT* 基因極可能在穎花發育的穎片分化及花器官分化過程中扮演重要角色；至於 *salT* 基因真正表現的部位。仍需經由原位雜合反應進行確認。

五、*salT* 基因轉殖水稻

進一步選擇 *salT* 基因，進行基因轉殖試驗，首先構築 *salT* 基因大量表現或抑制表現的質體(圖18)，利用農桿菌法進行水稻基因轉殖。結果各質體都得到轉殖水稻，轉殖效率為2% - 25.9%(表6)。以南方墨點法分析，轉植株有不同 copy *salT* 基因(圖19)。利用 Real Time RT-PCR 分析內生 *salT* 基因的相對表現量，發現各轉殖水稻間有明顯差異(圖20, 21)。但是進一步觀察轉植株性狀，發現除了水稻 TNG67 之 *p1USN* 轉植株形態類似 *slp* 突變體外，其他不論促進或抑制 *salT* 基因表現的 To 代轉植株，均無穎花大小及型態改變(圖22)，與試驗的假設不符合，無法證明 *salT* 基因對穎花內外穎發育的影響。

這個問題仍需再經下列試驗確認：

- (1) 分析 *salT* 基因在轉植株中幼花序的表現量：雖然分析轉植株水稻營養生長期葉片可以發現大部分 *salT* 基因有預期的表現，但是並未確定是否 *salT* 基因的表現可以延伸至生殖生長時期的幼花序組織上；必須確認 *salT* 基因的確在幼花序組織表現且不造成穎花性狀改變，才能下此定論。
- (2) 分析 TNG67 之 *salT* 持續性表現的轉植株：TNG67 之 *p1USN* 轉植株雖然在型態上與 *slp* 突變體類似，但由於轉植株過少，且生長狀況不佳，無法做深入的觀察與研究，必須提供更多轉植株才能加以分析確認。

(3) 分析轉殖株 T1 代性狀：雖然 *salT* 基因 T0 代轉殖株外表性狀，如：株高及穎花型態，看起來與未轉殖水稻無明顯差異，但是觀察 T1 代營養生長期性狀，發現部分轉殖株後代除有分離現象外，株高也變矮，約只有非轉殖株的 1/2，且葉色較深，類似 *slp* 突變體營養生長時期的外表性狀，此部份待植株生長至生殖生長期，值得進一步進行分析。

(4) 分析其他可能與水稻穎花有關的基因：根據劉(2003)分析，*slp* 突變體可能是由一個隱性基因突變後，調控其下游許多因子而造成型態上的變異；在下游基因中，或許除了 *salT* 基因外，另有其他基因與 *salT* 分別或共同調控穎花發育，這也可能是 *salT* 基因轉殖株穎花型態不如預期的原因之一。

附圖及附表



圖 3. *SLP/slp* 突變體自交後代分離出三種外表型的植株。(圖示為生長 90 天之植株)
(A) *Slp/slp* 突變體自交後代分離出的三種外表型，分別為：*SLP* 正常型(B)、*SLP/slp* 突變體(C)及 *slp* 突變體(D)。

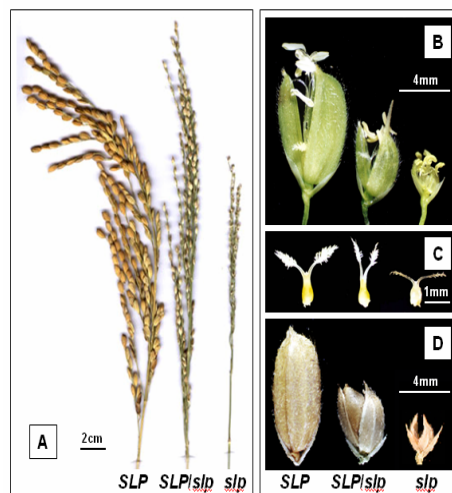


圖 4. *SLP/slp* 突變體自交後代分離出三種外表型植株的花序及穎花形態。
(A) 三種外表型植株的稻穗。
(B) 三種外表型植株開放中的穎花長。
(C) 三種外表型植株的雌蕊。
(D) 三種外表型植株的穀粒。

表 2. *SLP/slp* 突變體自交後代分離族群中三種外表型植株之穗長、各節間長及株高之調查。(單位：公分)

外表型 ^a	穗長	第1節間 ^b	第2節間	第3節間	第4節間	株高
<i>SLP</i>	24 ±1.7	35 ±1.8	17 ±2.6	13 ±2.3	8 ±1.4	121 ±7.0
<i>SLP/slp</i>	25 ±5.3	31 ±1.4	16 ±2.1	15 ±1.3	11±1.9	115 ±5.0
<i>slp</i>	13 ±0.6	17 ±3.2	10 ±3.1	11 ±2.7	12 ±2.3	77 ±12.0

a. 節間序號是由穗往下依序排列。

b. 每種外表型各取10株調查後之平均值。

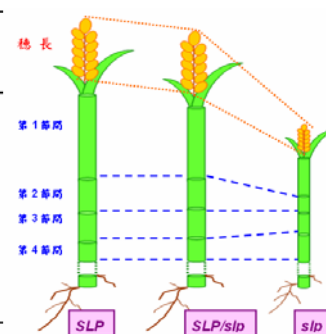


表 3. *SLP* 正常型與 *SLP/slp* 突變體之平均穗數、每穗穎花數、穎花密度、稔實率與千粒重調查。*SLP/slp* 突變體穗數比 *SLP* 正常型多，但穎花密度相當，稔實率及千粒重均不及 *SLP* 正常型。

外表型	平均穗數 (穗數/株)	每穗穎花數 (穎花/穗)	穎花密度 (穎花/公分)	稔實率 (%)	千粒重 (克)
<i>SLP</i>	17.3	157 ±11.8	7.3±0.8	55.5 ±11.9	23.7±2.0
<i>SLP/slp</i>	26.6	141 ±22.0	7.3±2.0	7.3 ±3.9	7.3±0.5

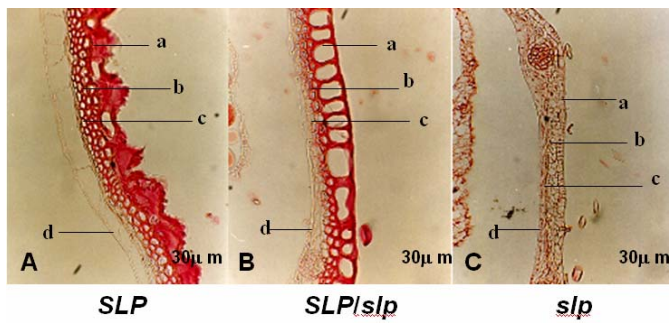


圖 5. *SLP/slp* 突變體自交後代之穎花外穎的組織切片觀察。(A) *SLP* 正常型, (B) *SLP/slp* 突變體, (C) *slp* 突變體。其內外穎組成由外而內為：外側表皮厚壁細胞(a)，皮下厚壁細胞(b)，薄壁細胞(c)，內側表皮細胞(d)。紅色為木質素染色的結果。

表 4. *SLP/slp* 突變體自交後代分離族群中三種外表型後裔之分離率調查。

外表型	株數	比率 (%)
<i>SLP</i>	15	21.7
<i>SLP/slp</i>	35	50.8
<i>slp</i>	19	27.5
總和	69	100.0
	X^2	P value
1:2:1	0.478	0.787

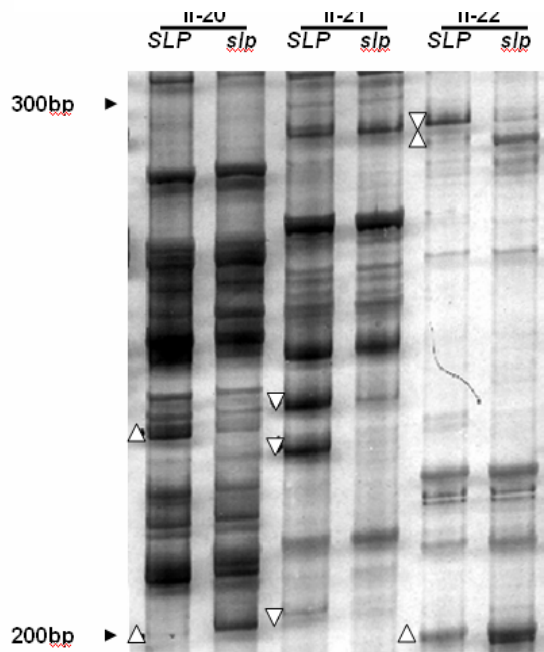


圖 6. cDNA-AFLP 之聚丙醯胺膠體電泳圖(部分)。▽ 為 *slp* 突變體表現被抑制的 cDNA 片段，共有 164 個。△ 為 *slp* 突變體表現被誘導的 cDNA 片段，共有 171 個，共 335 個具有差異性表現的片斷。II-20、II-21 及 II-22 為 cDNA-AFLP system II 使用之引子組合代號。

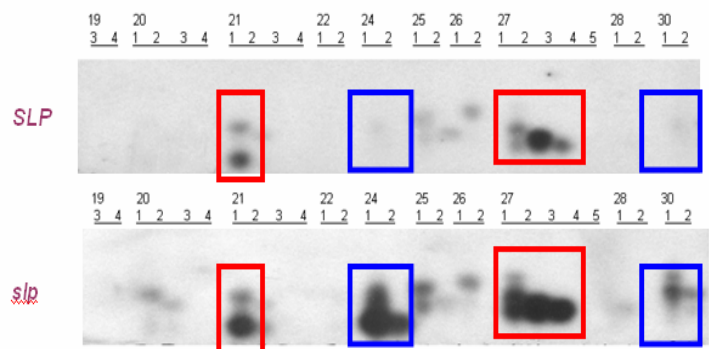


圖 7. 差異表現 cDNA 片段進行 Reverse Northern Blotting 篩選結果 (部分)。

SLP 代表 *SLP* 正常型 1-4cm 花序, *slp* 代表 *slp* 突變體 1-4cm 花序 mRNA。數字 19~30 表示進行 cDNA-AFLP 所使用的引子編號, 各引子可再分別得到不同的差異性片段, 以 1、2... 數字表示之。

表 5. 定序之 cDNA 相關 clones 與已知基因資料庫比對結果(部分)。

No.	Candidate or genomic clone
I-49-1 I-56-2 II-17-2 II-20-2 II-24-1	AF285163 salt-induced protein chr_1 P0440D10 2821
II-24-2	AF285163 salt-induced protein chr_1 P0440D10 2821
II-39-1	beta-galactosidase chr_10 OSJNBa0050M22 3168

II-37-1	CG9752 gene product chr_7 OJ1333_D04 2065 <i>Oryza sativa</i> genomic DNA, chromosome 7, BAC clone:OSJNBb0005G07.
I-42-2	chromatin remodeling factorCHD3-related chr_6 P0499E08 1895
II-33-1	helicase conserved C-terminal domain, putative chr_3 OJ1123F12 4380
I-35-2	microtubule-associated protein-like-related chr_6 OSJNBb0065C04 3775
II-4-2	myosin heavy chain, putative chr_1 P0694A04 2789
II-38-1	putative bifunctional nuclease-related chr_1 P0409B08 2704
II-36-4	putative gag-pol polyprotein-related chr_6 P0417G12 1960
II-19-1b	Putative retroelement-related chr_1 B1131G08 4438
II-1-4	ribosomal protein S6e, putative chr_7 OJ1119_F04 2014
II-62-1	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) chromosome 6 clone P0414E10. (AP005852)
II-6-1	DnaJ-likeprotein o_sativa chr_2 P0519E06 4335
II-20-1a	EF hand, putative putative chr_10 OSJNBa0051J07 3650
II-2-1	kinesin-like protein-related chr_4 OSJNBb0006N15 5373
II-41-1	protein kinase-like protein-related chr_12 OJ1587_D05 4939
II-21-2	putative transposable element-related chr_12 OJ1058_H10 5050
II-51-1	gibberellin action negative regulator SPY-related chr_8 P0562A06 5623 U2 snRNP auxiliary factor, small subunit-related chr_5 OSJNBb0053D02 4999
II-63-2	similar to cdc2 protein kinase chr_8 OJ1325_B11 3078
II-61-1	helicase conserved C-terminal domain, putative chr_3 OJ1123F12 4380
I-14-c	putative pectinacetylase chr_5 P0016H04 2965

- 備註：**
1. 資料整合使用 The TIGR Rice Database (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/osa1/>)之 Sequence Search 內 All Rice BAC and PAC Sequence 與 TIGR Whole Rice Genome Annotation DB: Coding Sequence 兩個資料庫。
 2. clone 的命名原則，以 II-19-2a 為例，表示該 clone 選自於 AFLP Analysis System II 第 19 個篩選引子組合，篩選的第 2 個差異表現 cDNA 片段；加註小寫英文字母，表示該 cDNA 片段重複選殖不同 clones，得到不同定序結果。
 3. I-14-c 為對照用之 cDNA-AFLP 中無差異表現片段。

1 C T C C C C C C C A C C C C G C G T C G T C T C A A A T C T C C T C C C A T C C C C C A C C G A T G A T C T G C C G T A A G

61 A C C C C A A A A A A A A A A A A A A A A A A A T C T G G A A T G G A G C A C G A C A G A A C C A A G A A C

121 C C G C C G C C C G C G C G C G C G C G C A G A G T C T C G C G A G G A T T G C C C C T G C C C A C C G C C C

181 A C C A C C A C C C C G C C G C C C C T C A A C T T C G A G T G C G C G C C C T A A T G C A C C C G C C C A T

241 T C G C T T C A T C C C C C G T C G C C A C C G C A T C C G C C C C A C C C C G C C G C C G T C T G C G T A A G

301 A T A A G A C A A A C C G C T T A C T T T T G G A T T T T T G G G G A T T T T T G T T T T T T G T C G T A G

361 T G A A T T A A C C A C C A C C G G T T C G C C C A C C G C G A G G A G A T G C C C C A A G G A A T A A G A C

421 C A G A G A T T C A A C C G A T C A C G T A C G T A C G T A C G T G C T A C T G C A G A G T G C A G A G G A G G A

481 C G G C T T C T C A A C C A G G T C A C G C G C T A T T A G T G C A G A G G T G C C A G A G G A G G A G A

541 C G C G C C G C C C A A A G C C T G C T C G T C G C C T G T G G T A T G G G T C C G C C A A C C T C A C C T C

601 T T C A T G G T A T T A A T T A T T A T T A T T G G T T A C T A G T T G C G A T G G A C T T A G T T G C A A C

661 G A A T T A A A G A G A G A A A A A A A A T C G A T C G A T T T A C C A T T C C A A A T A A T C A A A G

721 A A T T C A T T T G C A G T T G G A T T T G A T A T T C C C C C T A A A A T C T T T G A T A A A A T T C

781 T C T T T A T T G T T G T T G T T T C A G A T C A C A G T T T G A T A G T C C A A T T G C T T T G A A T A G T

841 G T T G C A G G T T A G G C A G A T T C A C C A C C A T T G A G T C T T T A A A A G A G T A C A G A T G C T A A

901 T T T T C T G A A T A G A T A A A C T G A T T T A C A T G T C A C C C A G G A G T G A G G C T G A G G C T G G

961 T T T C G T A C C A C T A A C A C C T T T G C A T T C T C A G T T C G A A T T G C T A C G T T A G G C T A

1021 C A C A C T C A C C A C C A C C A C C A C C A C C C G C C G C T A A A G A T T C C A C C C A G T A C A G A T T G G G

1081 G C A A C T C T C G A C T T C C C A A A G C C A T T G G T C C G C C T G C A C T T G C T A C T C A T T C A T T C A G G T

1141 C C T C C A A A G A T C A C A T C C T C G A C C T T T G G A G C C C A A G A A C C A T A G G T T T C T A C A T

1201 A G A G G A C C G C C A G C A G A C A C C T C A C C T C A A G G C C C T C C A G G G T C A C G A C C A C T A C T

1261 T T T C T G A A T T G T T T G T G C C T A A T T A A T C A T G C A A A A T C A T T A G T A T T A A C T G G A

1321 T C G C T A T A T T T A C A G G T T G G T G T C A A C T A C T A C A G A G A T T T T C C G A C C A T T T G T T G T

1381 G C G C T A C C A A C C A G C A G G A C C A C C T C C C G C T A A A G A T T C C A C C C A G T A C A G A T T G G G

1441 G A C C A C A G G G C T G A T T A C T A C G T C T C A G T T T T A T G A C C A A G G C A A A A G A T G T C T C T

1501 T A C G T A A G A T A A A C T T C C T A A C C T G G C A G G T T G C T C T T C T C T T T T C T G C C C C A A C C T

1561 T C T A G C T C A A T T G G T A T G T G T T G C A T A A A T T T A G C T A A T T T A G C T A A T T C G A T C A T C A

1621 G C T T A C T G G A A T C C A C C A G A A A A G A A T C A A C C T T C C T C T C T A A A C C G C C A A A C A G

1681 T C T A T G C A T G C C T T A G T A A T T G T C C A A C C T A A C A A C C A A C A G A T T T G T A C A

1741 T A T A G A C A A A C C A A G A T A A C T C G A T T C T C G A A G A T T C T T A T T G C A A A G A A C A A G A C A G G

1801 G G T A G G C T C G T A T A G C C T T T T G G T A A G C T A A C A A G C A T A A C C T T C T C T T T G T A T A

1861 G G C T G C A C C A A A A A A A A T A T C A A A C A G T T T G A C T T C A C C C A T G A A G T T C T A C

1921 A A G T A T T T A C C T T A A A A T G C A A G T T T A G C A T T T G T C A G G A C C T G C C G G T A G T

1981 A G G A T C G A T C A A T A T A T T G C G G T C G A T A T G A C A T T G C T G A I A A A G A T G T T A A G A

2041 T A A A C A A G C A A C T C A T G C C T A G A T A T T G T C T T C A C T A A G T C A C C A A A T A G T A C T A

2101 C C T T T T A G T C C A A G G A T A T G T C G G T G T G A T A T T G A T C C A G T C C A T T T T G C C A T A T G C

2161 T A C A T A T T G T A T A C A A A T A T G T A C T A A A C C A T C G A C C A G G A C T A C C A T T T T A C C T

2221 G T T G T G C A C A T A T T G C A T A T G C A G G T C G T C T G T T G A A C G A T A C A C A T T A A A A A G

2281 G T A C T T C C C C A A T C A A A T A T A T T T C C T T G C T T G C T T G T C T T G T A G G C T G A A A G A T

2341 C T G C C A A G A T C A G T T T T A C T C T T G C C T T G C C T C G C T C G A C C A A G T G G C A A T G A

2401 A C A A T A C T A A C C T T T A C T T G A G T G C T T A A A A A A T C A A A A G C A A A T A A A T G A C T T A C C

2461 T A C C G A T C C C A A A A C C T T G C A A A G C A G T T T A T C A C A A A C A A T G C G A C A A G A A G

2521 G A A T C G C C A G C C T G A A T C A A I A A T A G T G G T G A A A A A G C G G A C A A A C C T C A C T G C A A

2581 T A G A A G G T C T A G A A A T T A A T A T G A A T A A A A G A T T T A G A C T T G G A T T T C A T T A C

2641 A A A G T G A C T A A A T T A G G T T T A T T T C A C G C A A G A C C G C C A A C A I T A A T T T C A A C G A

2701 A A A A A T T C G A A A G C T A A T C T G A C T T C A A T A A A G A T A A G A A A A A T T A G C T A A A C G A

2761 A A A T G A A G G A G A C T A A T T G A A T T A

2821 T A A A T T G T T T T G T T G T T G T C G A A A A A T T T T T T T C C A A G C A A A A T T A T T A G A A G

2881 T A C A A A A C T G A C A T T A A T T G T A T A C T C T G T G C G G T T A T C A C A A A G A T A A C A C A T

2941 G G G C A T G A A A T T G C C T T T A T G C T C A A T T A G C A T A A C A A T T T C A A C T T T T G A A C A T T A

3001 G G A G A G A A T G C T A C G G A T T G C T C T A A G A C T G G T A A C A A A A A C A A G T C A C A A C A G

3061 C A G A A T A C A A G C T A G T T A G T A T A A A A G A C C C C A T A C T A G C A T T T T T G G T G A T T A C A

3121 T T G A G T A T T T A T C T T G G A C C T C C T A C A T A T T A T G A C A G A A G A T A C A A C C A T A G T A

3181 G G C A T G C A A A T C G A G C T G C A T A C T A A A A G A G T A C A T A T T A G T T T C C T T C A G T

3241 G T G T C C C A A A G T A A A G C C T A T T A T A T A A T T T T G G A G C A A A A T G C A G G A T G T C T G A A

3301 A T A G A A A A C C C G G A A G T T A A A T C A T C T G A A T G C A A A A G A A G T G G T A C T T C C A G C A C A

3361 C A A G A A T T C A A A A T A C T A C A A G A A G A G A T C T C T T C A A G A A A C C C T A C A

3421 A T C T G T T G G A G T C T G A T A A A A C G A A G C C C C T G A T C T T C A G A G A T A A T T G C

3481 C T T T G C A A A T A T G A A C C G G A A A T C A T A G T A C A A C T G G A A T T A G C C T G C T C T A T

3541 C A C T G G T A T A G C A T C A T T T A T T A T T G T G C C A A G T T C A T A C G A A A T G A A A A T

3601 T G A T C A A A T A A C C A C T G A C T G G C A C T C C C A G A A A C C T T G T G A G A A A C A C T C C T G C C A C

3661 C A G T A C C C A T C C T C C C A A A G T T A G A T A C C C A C T G A G A G A T T T C A A A C T A T T A G A

3721 C T T C T T A G C A C T C G C C C A G T A G A G C T G A G G G C A G A A A A G T G G G A C A T A A A T T G C C C G

3781 G A A A T C A A C A C A G A T T G C A C C A G A C C A A A A A C C T T G A A G T G C A T T T A A A A T T G A C C A

3841 A G C A A A A A T C C C A A G G A A A A

圖 11. . *Kinesin-like* 基因序列。

Kinesin motor domain (kinesin-like) 基因序列源於The Institute for Genomic Research (TIGR) 網站2004 年 10 月 4 日 資料, 編號9632.t02893, 屬於未發表之基因組DNA 資料。黃色部份為基因組序列中與mRNA 序列相似的部份, 可能為exon 區域。代表與劉(2003)選殖片段相同的序列, 數字部份代表鹼基數目編號, 紅色粗體部分為 Real Time RT-PCR 反應引子設計的位置, 5'Kinesin 及3'Kinesin 引子擴增片段為 300bp。

1 GGCGCTCTCTCTCCCTCCGCGCGCGCGCGCGCAACACCGCCCGCCCGCCCGCCCTCCCG
61 ACACGCGCTCGCGCTCTCGCAGCAACCGCGCTCGGCGAGCGGAGGAGGAGGAGCTCTT
121 CTCTCTCCGCTCCAGCGGCGCTCGCGCGCGCTCTCCGCTCCGCTCCAGCGGCGCTGCTGTGATGAT
181 CTGATAGGAGCGGCTCGGCTCTCTCTCTCCGCTCGGAGGAGCGAGCGCTTTGGCCTAGGATCT
241 GTAGCTCGGTTGTTTCTGGGTTTCTCTGGCTTTTTTTTTTAAATTTGTGGCGCGCAAC
301 CTGGGATCGATTCAGCTCTGTGATTTGTGTCGAGAGCTGCTCGGCTGATCCGCT
361 CTGATCGCTGGTTGTTTGAATGTAGTGTCTTATACCGTGAGTGTAAATACATGCAATAC
421 AACTTGTGAATTTGGCGATGGGATGAACCCATTAAGTTTCTCGCTGAGTCCGCCCTATG
481 TAGTGTGCAATATGTATATCACTCGAGCTCTATTAGAAGATGGTCTCTTATGTCAA
541 TGTATGCTGTGGTATATTTTTCTTTGTTGCGAGGATATAGTTTGTACTAATGCTACTCA
601 TTGATGTTATGCTTCATGATTTTGATCTGATCCAAAGTTTACGTTTGTAGGAAGCG
661 CTTTTTATACGTCATGTACGGAGCGATCGGAAAGGAAGTAACAAATACCAAGTATTAGA
721 GGTGCTGGGTGATCTAAGACGAGCAACCCGAGATGAGCTGAGGAAGCGACCGGTAAGG
781 TGCCATTAACCAACCCCTGATAAGGGTGAGAGCGCTGAGGAAGCTGTGGGAGCAACAGAT
841 TCTATTGTGTCTACTCTTGAAGCTTGGTTTGGTTGGTTGAGCTTTTACTTTTATGTGG
901 CTGTGCTGAGCTTAAAGAAATGGCTCAAGCTTCAGAGGCTCTTAATGATCTCGAAAGAGG
961 GAAATCTATGACCAATATGGGAGGATGCATCAAGGAAGGAATGGGAGGAGCGAGCG
1021 AGTGATTTCCGATCGCCTCGATTATTTGAGGCAAAATTTTCAGAATCTGTGTTGGCTTT
1081 GGGGTAATAAAATATAAAAAATGCTTTACTTTTGATCTCTTATCTCTTATTTTATAGA
1141 ATAAGAAATGACCAATTAAGTTTGTGGTGGTTGGAAGTAGGTAGAGGACACAGCAAAA
1201 CGCTGGCGAAGATCTGTACATCACTATGAAGGTTCTTTAGAGACCTGTAAATGGTAT
1261 **ACCAAAAAAATGCTTTGTACGGAAGTGCCTGTGCAACAAATGCAAGGGGTAAAGTAT**
1321 TTGCACATCTCGAGTGTTCTTTCTACATGAAGAGGATGTTATTTGTTATGCTTGAA
1381 TTATGAATATACAATTTATAATAATAAATCAATTTAGCTGACAAATTTATAATATTA
1441 TAACTATATGAGCTCCGCTGAGCACTCTGGGGGTTTACTTTCTTATCTTAAACTTAA
1501 GTTTGTCTTCAAATTAITTTTGATCACTTTGAGTGTAAAAAGCCCTGCAATCTTAT
1561 TCTCATATAACATTTATTTCTGTTTGTGTTATTTTATACATAGTGGAAGCAGCTTTGAT
1621 TAAATACGTGTAGCTGTAATGAACACGAACATTAATGGTTCAATTGACAAATGCTAT
1681 GTTTAATCTATGGGAAGTCAATCTAGTTTACAGCTGAAAAAGCTGTGGGCTGATCT
1741 GCAACGGGCTAACGATCACTGCGTAATCTGTCTATCTGTTTGTGTTTATAGGCATTT
1801 AACAATGATTTTTTCCGAAAGTAAAAAATGAAAAATATAAGAAAGCAATATGATTA
1861 CAAATTAATGTGAATACAGGCGCAAGTGAACAAAGGAAGGAAGTGAAGCTAGCTAT
1921 ACTTGGATTTGAGCTGAATATATACATATGTTGGTAGATGTGAAGACCTGTTTGTTCGAG
1981 CTATGCTGTGTGACGAAGCTTCTCGCGGCTCGACTCTGACGTTTGATGGATGTGTT
2041 TGAATAAATATGATGATTTGTGCTCTGATGATGCTGATGATGATGATGATGATGAT
2101 TTTGTAGACAGCGCTCAACCAAGTAATATGTGATGACACCAACATGCTACCC
2161 ACTTCCCCTTTAAATCAAGGTGAAAAAATATTGTTGCTGAAGGTGGGGGTGAAC
2221 CTGATGACCTAGATGAGCATCTGTGGAATATGACATAGGCGCTCTCTCTGTGAACA
2281 ACAAAACCGATTATCTTTTGTGATTAATACTACATCTGTTTCTGACTTGGCTACTT
2341 GCTGTATGTAGGCAATCTGAGCTCTGCTGATAGCATCGCAATTAGGTGACAGGGT
2401 TGGATTTGACCGCACTACGAGATGCAATTTAGTCCGAACTTCAGTGAATTTGA
2461 TGGTCTCTAAGAAATGAAACTTGCAGTTTGTACTCTGTACTTGTAGTGCTCAATTTGTA
2521 CTCAAGTTTAAATGACTTTTTTTTTTTCTGATTTTGTATTTGGTCTCACTGTGGCTT
2581 ACGTTTGTCTTCACTTCAAGTAAGGATCAAGAGTGGGCGAGCAACCTGCCATGGTGTG
2641 TCAATGTCAGGAATGAGAACAATAACAGCAAAATGGGCTTGGCATGCAACAGAT
2701 GAACACTGTTTGGCCTGAATCGAGAGATCAGGATGCCATTTGTTGATCTTCATTAAGA
2761 GACATCTCTGTTGAGTTTGGCTTAATGATTAATTTGTCCAGGTGATGATGATAAGTGA
2821 AGGATAATGCCCGAGTTGTAGAAGGAACATGAGTTGTCAGGAGGAGAGGCTTGTGGAG
2881 TGAATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
2941 **AGCTGTGAGTCTTATTAACAAGTATCAGGCGTATGTCGAAATGTGGCAACTCGC**
3001 ATCTTGATGTGTGTTCATAATATGTTGGAGCTCCCATCTAACATTCGAAATCATGCT

5' DnaJ-like primer

3061 TTTGCA**CGTGTACAGCTGACACGGAGACATGTTT**TGCTTGCAACTTTAAGACCACCG
3121 **AAAAATTAAAGGAAGTTTGATGACCTCTT**ACTGAGCACACAATCTCCCTGACCGAGGCG
3191 **CTGTGTGGCTCCAGTTTGTTCTAACCATCTTGATG**TCGGCAACTCCTAATCAATC
3261 **TAATCCAGGGGAGGTTATAAAACCTGGT**ATGCTTTCTCTTTGACTCTTTATCCAACTG
3331 CTGTCTGCCTTTATAGTTCTGTGTGGACATGTGATAGATGATTTCTTGATAG**GGTCA**
3401 **ACACAAGGCCATCAATGATGAAGCGCCGACGATGGCCCGCTTTCATGAAAGTCCG**
3471 **CTTTTCTTGTAATTCAAGCTGGAGTTTCT**GAGCCTGGTGCACTACCTGTGGCCAAT
3541 **CCGATCGCTGAGAAGATTTGCCAC****CCAGCCGGAATATGTCAG**ACATGGAGCT

3' DnaJ-like primer

3541 AGATCAATGTGAGGAGACACCCATCGATGATGACATCAAGTAGAAGGAGATGAGGCGCAG
3601 GCAGCAGCAGACGGCGGCGAGGAGCATGATGAAGACGAGCAGGAGATGCTGAGCTGG
3661 ACCAAGGCTACAGTGTGCCCAAGCATGAAGACAATTCATGCCATTCGCATACGCAAT
3721 TAGCGCTCTTATCATCCAAAGCCGCGGTAGCTCATGATGATCTCTATCTTTTTTT
3781 AATGATACCCCACTAAAGTAGTGCATGCGATTTGATTTTCTCTTTGTGGGAAATGG
3841 ATGCTACCAATTTTCTGCTCTTAAGATTAAGGAGCTGCTCATATGCTCAATGATGTTGC
3901 GGCTCTACCTACAATATACAGCTGCGGATATATACACAAATGAGCTAATGCTCGAG
3961 AATAATCTTACAGACAGCGGACCGAATCAGTTGATATATCAATATATGCTCTGGTTCT
4021 GT

圖 12. *DnaJ-like* 基因序列。

DnaJ-like 基因序列源於 The Institute for Genomic Research (TIGR) 網站 2004 年 10 月 4 日資料，編號 9630.t04084，屬於未發表之基因組 DNA 資料。黃色部份為基因組序列中與 mRNA 序列相似的部份，可能為 exon 區域。____代表與劉(2003)選殖片段相同的序列，數字部份代表鹼基數目編號，紅色粗體部分為 Real Time RT-PCR 反應引子設計的位序，5' DnaJ-like 及 3'DnaJ-like 引子摘頭片段為 382bp。

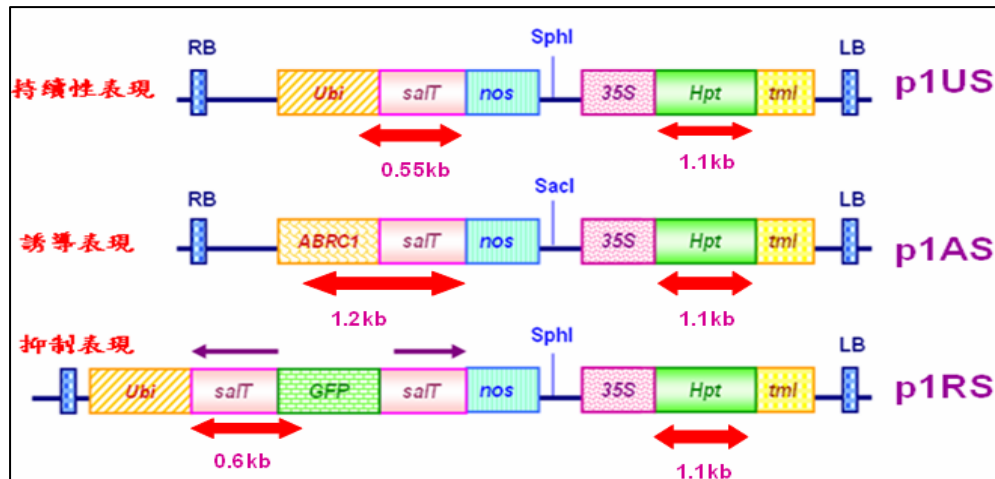


圖18. *salT* 基因構築圖譜

- (A) 誘導表現構築圖譜(p1ASN)：以ABRC1啟動子（受ABA誘導而表現）驅動*salT*基因，其在SLP品系植株可受ABA誘導而大量表現。
- (B) 持續表現構築圖譜(p1USA)：以玉米的*ubi1* 啟動子（持續性表現）驅動*salT*基因，使其在SLP品系植株中持續大量表現。
- (C) 抑制表現構築圖譜(p1RSN)：利用RNAi的原理，抑制SLP品系植株中內生*salT*基因之表現。

表 6. 水稻台農 67 號及 SLP 品系以農桿菌轉殖 *salT* 基因之轉殖效率。

水稻材料	質體	代號	轉殖癒合組織 ¹	抗 hygromycin 轉殖癒合組織 ²	再生植株之癒合組織 ³	轉殖水稻株數 ⁴	轉殖效率(%) ⁵
TNG67	p1ASN	TA	44	2	1	1	2.0%
	p1USN	TU	42	2	2	2	4.8%
	p1RSN	TR	56	7	4	5	7.1%
SLP	p1ASN	SA	54	19	14	32	25.9%
	p1USN	SU	33	3	2	2	6.0%
	p1RSN	SR	81	29	10	14	12.3%

- 1 轉殖癒合組織：進行農桿菌感染之水稻癒合組織總數。
- 2 抗 hygromycin 轉殖癒合組織：經過含抗生素 hygromycin 篩選培養後，具抗性的水稻癒合組織總數。
- 3 再生植株之癒合組織：抗 hygromycin 的水稻癒合組織中，具再生能力的總數。
- 4 轉殖水稻株數：獲得確認為轉殖株的數目。
- 5 轉殖效率(%)：轉殖效率，由 regenerated No. of calli / No. of callus infection 公式計算而來。

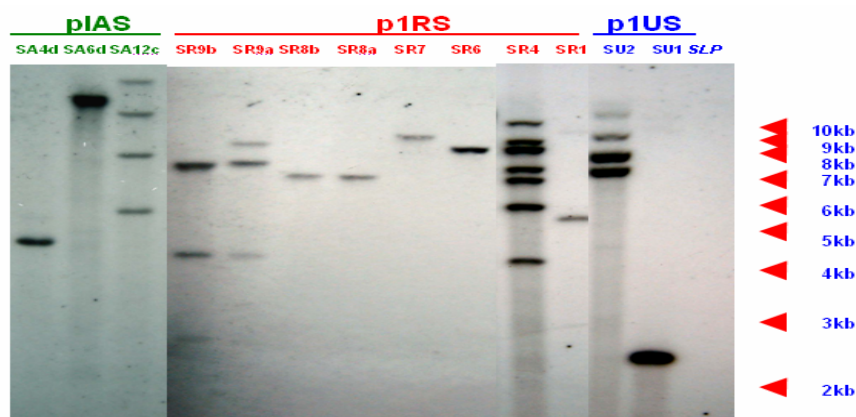


圖 19. 水稻 SLP 品系 *salT* 基因轉殖株之南方氏墨點法分析。

自 SLP 品系水稻 p1USN 及 p1RSN 轉殖株取 20μg 基因組 DNA，未轉殖的 SLP 及 p1ASN 以限制酵素 *SacI* 進行酶切，p1USN 轉殖株(SU)以限制酵素 *SphI* 進行酶切，p1RSN 轉殖株(TR)以限制酵素 *KpnI* 酵素進行酶切；於 0.8% 瓊脂膠體進行电泳後，轉漬於尼龍膜，以 Dig 標定之 *hpt* 基因片段為探針進行雜合反應。M 代表 1Kb Marker。

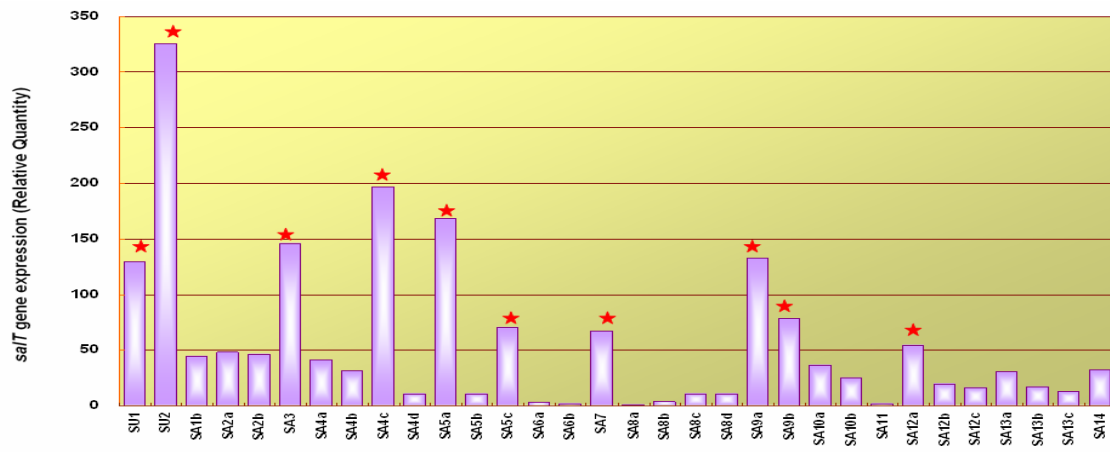


圖 20. 水稻 SLP 正常型 p1ASN 及 p1USN 轉植株 *salT* 基因表現量分析。

萃取水稻 SLP 品系之 p1ASN 及 p1USN 轉植株葉片 RNA，利用 Real Time RT-PCR 分析內生 *salT* 基因的相對表現量；SA 及 SU 分別代表 p1ASN 及 p1USN 構築質粒。★表示表現量比 SLP 未轉植株大 50 倍之轉植株。

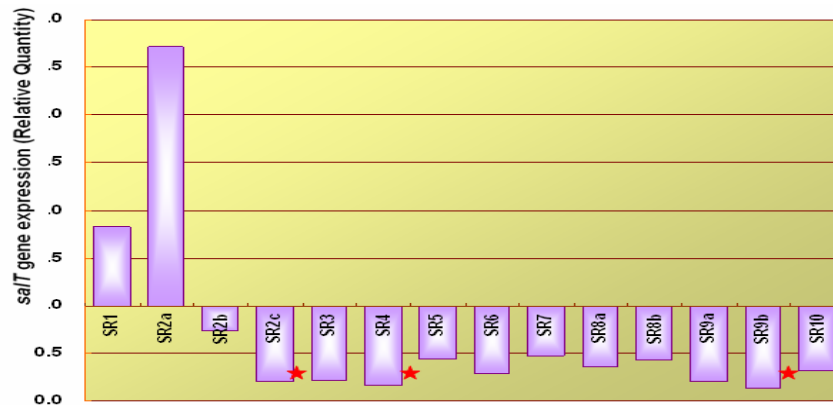


圖 21. 水稻 SLP 品系 p1RSN 轉植株系抑制內生 *salT* 表現量分析。

萃取水稻 SLP 品系之 p1RSN 轉植株葉片 RNA，利用 Real Time RT-PCR 分析內生 *salT* 基因的相對表現量；橫軸代表轉植株編號，SR 代表 p1RSN 構築質粒。★表示抑制 80% 以上內生 *salT* 表現量。

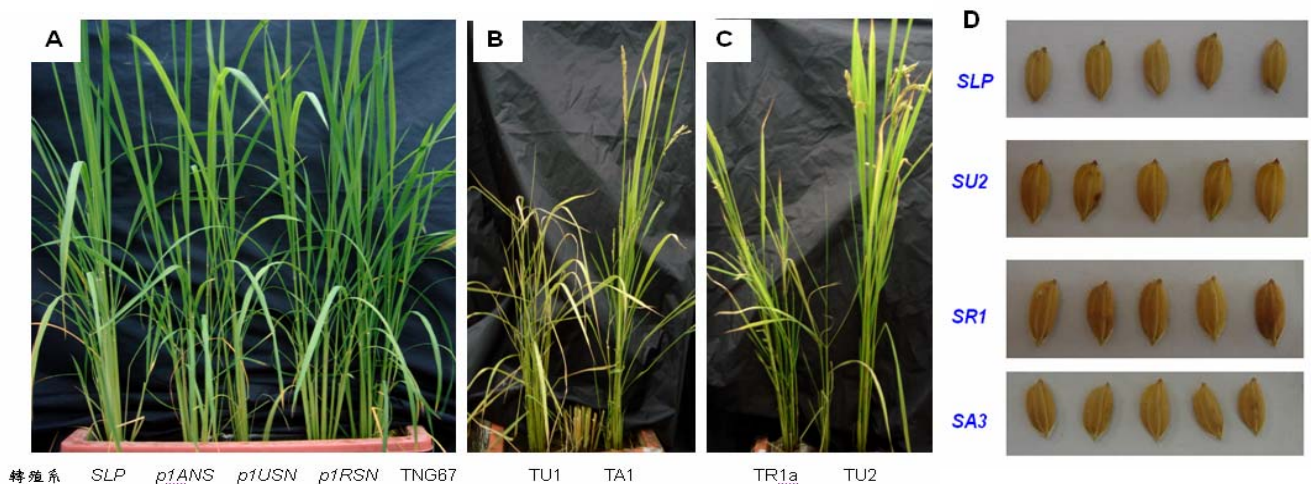


圖 23. 水稻 *salT* 基因轉植株外表性狀及穀粒型態。

(A) 營養生長期轉植株的外表型態。

(B) TU1 植株為 p1USN 促進 *salT* 表現轉植株，TA1 植株為 p1ASN 誘導 *salT* 表現轉植株，TU1 比 TA1 矮。

(C) TR1a 為 p1RSN 抑制 *salT* 表現轉植株、TU2 為 p1USN 促進 *salT* 表現轉植株，TU2 比其它植株矮。

(D) SLP 轉植株系穀粒型態,SA 為 p1ASN 轉植株系,SU 為 p1USN 轉植株系,SR 為 p1RSN 轉植株系,SLP 為非轉植株。

參 考 文 獻

- 曾東海、鄭清煥、陳治官、顏信沐、鄭統隆、卓緯玄和王強生 (2003) 水稻臺農67號同源突變系對褐飛蟲之抗性探討。中華農藝學會九十二年會作物科學講座暨研究成果發表會。中華農藝學會。第30 頁。
- 劉昌郎 (2003) 水稻內外穎退化突變體相關農藝性狀及基因表現之研究。台灣大學農藝系碩士論文。
- Claes, B., Dekeyser, R., Villarroel, R., Van den Bulcke, M., Bauw, G., Van Montagu, M., and Caplan, A. (1990) Characterization of a rice gene showing organ-specific expression in response to salt stress and drought. *Plant Cell* 2 : 19-27.
- Ferrario, S., Immink, R. G. H., and Angenent, G. C. (2004) Conversation and diversity in flower land. *Curr Opin Plant Biol* 7 : 84-91.
- Garcia, A.B., Engler, J. A., de Claes, B., Villarroel, R., Van Montagu, M., Gerats, T., and Caplan, A. (1998) The expression of the salt-responsive gene SALT from rice is regulated by hormonal and developmental cues. *Planta* 207 : 172-180.
- Joen, J. S., Jang, S., Lee, S., Nam, J., Kim, C., Lee, S. H., Chung, Y. Y., Kim, S. R., Lee, Y. H., Cho, Y. G., and An, G. (2000) leafy hull sterile1 is a homeotic mutation in a rice MADS box gene affecting rice flower development. *Plant Cell* 12 : 871-884.
- Jang, S., Lee, B., Kim, C., Kim, S. J., Yim, J., Han, J. J., Lee, S., Kim, S. R., and An G. (2003) The *OsFOR1* gene encodes a polygalacturonase-inhibiting protein(PGIP) that regulates floral organ number in rice. *Plant Mol Biol* 53 : 357-369.
- Kagaya, Y., Ohmiya, K., and Hattori, T. (1999) RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants. *Nucleic Acids Res* 27 : 470-478 .
- Luo, Q., Zhou, K., Zhao, X., Zeng, Q., Xia, H., Zhai, W., Xu, J., Wu, X., Yang, H., and Zhu, L. (2005) Identification and fine mapping of a mutant gene for palealess spikelet in rice. *Planta* 221 : 222-230.
- Prasad, K., Sriram, P., Kumar, C. S., Kushalappa, K., and Vijayraghavan, U. (2001) Ectopic expression of rice *OsMADS1* reveals a role in specifying the lemma and palea, grass floral organs analogous to sepals. *Dev Genes Evol* 211 : 281-290.
- Tang, W. and Perry, S.E. (2003) Binding site selection for the plant MADS domain protein AGL15 : an in vitro and in vivo study. *J Biol Chem* 278 : 28154-28159.
- Wainberg, Y. G., Maymon, L., Borochoy, R., Alvarez, J., Olszewski, N., Ori, N., Eshed, Y., and Weissa, D. (2005) Cross talk between Gibberellin and Cytokinin: The *Arabidopsis* GA response inhibitor SPINDLY Plays a positive pole in Cytokinin signaling. *Plant Cell* 17 : 92-102.