

2014 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 060009

參展科別 植物學

作品名稱 揮發性化合物抑制水稻去白化的分子機制

得獎獎項 大會獎：三等獎

候補作品：1

就讀學校 國立南科國際實驗高級中學

指導教師 陳郁蕙

作者姓名 黃怡寧、馬悅華、黃聖龍

關鍵字 揮發性有機化合物(VOCs)、月桂烯(myrcene)、
去白化現象(de-etiolation)

作者簡介



(左起：馬悅華、黃怡寧、黃聖龍)

我是黃怡寧，出生於英國牛津，很喜歡彈琴，幼稚園開始練鋼琴音樂也是我的最愛，在緊繃的課業下音樂是我舒壓最好的方法。從小跟爸爸做實驗玩，小六全家跟著爸爸在維也納居住半年，在維也納基督教學校 (VCS School)學習到很多的東西，尤其是分組做科學實驗很有趣，維也納學校訓練present很有幫助。怡寧小六科展研究植物相剋，只得台南市優等，檢討認為研究工具不夠創新，國中改良研究工具後，參加國中參加全國科展第三名，高中學了分子生物，科展實驗加上分子生物的探討，繼續參加全國科展，得到第一名。

我是馬悅華，就讀南科實驗中學三年級，從小就喜歡探索，也很羨慕有做科展的同學，常常會好奇的陪在旁邊，一起學習。上了高中有機會參加科展使我興奮不已，認真投入後才發現，原來還有好多知識等待我們去挖掘和學習，在這兩年的科展中學到了很多，我也很高興能有那麼好的合作夥伴，能夠互相打氣與合作，還有那麼好的老師，願意花那麼多時間陪我們，幫我們隨時補充知識。

我是黃聖龍，我從小就對數理方面有極高的興趣。由其是生物實驗，無論是動物或是植物，我都非常仔細分析它們的行為模式，再去跟老師討論。目前就讀於國立南科實驗高級中學，在參加科展之後，我發現實驗的內容當然是不能輕忽的，而組員間的合作與討論更是重要。更感謝許多老師的教導與鼓勵，讓我們隨時都能如海綿般的吸收大量知識。

摘要

植物受逆境時常釋出VOCs (Volatile organic compounds)。本研究首度發現一種VOC-月桂烯(myrcene)可抑制水稻芽鞘之去白化現象(de-etiolation)。我們分別在螢光顯微鏡與穿透式電子顯微鏡(TEM)觀察水稻芽鞘，發現葉綠素分布與葉綠體分化均被月桂烯所抑制。研究發現水稻在月桂烯處理下去白化現象受抑制，是因葉綠素合成相關基因ACSF被抑制所致。同時有一些參與光合作用光反應、碳反應基因表現也有受影響。月桂烯影響光合作用相關基因，有三種不同類型：一、黑暗下基因產物幾乎不表現，照光後才累積，累積量受月桂烯抑制，如RCA、ISP、G3PD；二、在暗處下基因產物之累積就被月桂烯大量抑制，如ACSF，ATPS；三、黑暗下基因產物之累積受月桂烯抑制，同時月桂烯抑制照光後光誘發基因累積速率，如FNR。由基因產物累積量推測轉錄因子MYB-TF1參與月桂烯抑制去白化現象，且推測RCA、ISP、G3PD為其下游基因。我們進一步分析轉譯後修飾，在磷酸蛋白分析中，我們發現月桂烯會抑制35 kD 的phosphoprotein (pp35) 之去磷酸化，這暗示pp35可能參與月桂烯抑制水稻去白化現象。VOCs含天然毒素，可抑制附近植物生長，可為天然農藥。

關鍵詞：揮發性有機化合物(VOCs)、月桂烯(myrcene)、去白化現象(de-etiolation)

Abstract

All plants release a large number of volatile organic compounds (VOCs) into the surrounding area during growth or when exposed to environmental stress. In this study, for the first time, we found that myrcene inhibits de-etiolation. The result indicated that when rice seedlings exposed to myrcene, they would showed reduced accumulation of chlorophyll during illumination. This is because of the reduced expression of the chlorophyll synthesis related gene of *ACSF*. Using transmission electron microscopy (TEM), we found that the differentiation of chloroplast was inhibited under myrcene treatment. To increase our understanding of molecular mechanism of the modulation of the greening process, with the help of bioinformatics, the mRNA level of genes involved in chlorophyll synthesis, calvincycle, photosystem components were simultaneously examined. We found that there are three molecular mechanisms to suppress the phenomenon of de-etiolation. First, the genes almost did not express during darkness; however, illumination induced the gene expression at different rates, such as the genes of *RCA*、*ISP* and *G3PD*. Second, the genes of *ACSF* and *ATPS* strongly reduced expression during darkness. Third, myrcene inhibits gene expression during darkness and at the same time reduced accumulation of gene expression during illumination, such as *FNR*..The result showed that MYB-TF1 transcription factor involved in de-etiolation and *RCA*、*ISP*、*G3PD* were the down-regulated genes. We further analyze post-translational modification, in the analysis of phosphoproteins, we are surprised to find that myrcene will inhibit the 35 kD phosphoprotein (pp35) dephosphorylation, implying that pp35 may be involved in suppression of rice de-etiolation. Allelochemicals can act as natural toxins. In order to protect the ecological environment we could make use of plants' natural VOCs to reduce the use of any chemicals.

Key words: VOCs、myrcene、de-etiolation

壹、 研究動機

在高一基礎生物課程中，我們學到植物對於環境的刺激會有許多反應，來增加其生存的優勢。在自然環境下，植物常要面臨四周大量的壓力，包括非生物壓力(abiotic stress)與生物壓力(biotic stress)。非生物壓力例如水分的含量、化學物質、光線強度、空氣品質或溫度高低；在生物壓力方面，植物可能遭受病原體感染，例如病毒、細菌、真菌，或是遭受動物啃食。而當植物面臨競爭壓力時具有相剋作用，此為生長在同一環境之植物，搶奪地盤的策略之一。這顛覆了大眾所認為植物天性又聾又啞的概念。既然植物無法像動物般利用移動來逃避許多敵人或壓力，那麼植物要如何適應環境或逃避這些壓力？或如何與外界溝通？這是件有趣又很重要的問題。

科學家們發現，VOCs (Volatile organic compounds)是一群揮發性的小分子有機物質，空氣中常含有許多的VOCs，尤其是空氣污染嚴重的今日，我們可能沒有注意到這些VOCs 就圍繞在我們四周。而許多植物也能散發VOCs (通常是terpenoids類的物質)，植物利用本身所散發出VOCs能與他種生物產生許多奇妙的互動。例如吸引昆蟲來傳粉、引誘動物來散播種子或果實，植物也可利用VOCs來溝通、被草食動物宿主辨認、產生植物防禦反應，以及利用植物的相剋作用(allelopathy)來抑制其他植物的生長以避免競爭，關於VOCs的作用機制還有待研究與探討。

我們在進行專題研究課程時，觀察到植物所散發出的一種VOCs—月桂烯(myrcene)會抑制植物的去白化現象(圖一)。目前已經發現有多種植物會製造月桂烯，例如柑橘類(Citrus sp.)之果皮、番茄(Solanum lycopersicum)、魚腥草(Houttuynia cordata)、台灣肖楠(Calocedrus macrolepis var. formosana)、月桂(Laurus nobilis)、啤酒花(Humulus lupulus)、西洋芹(Petroselinum crispum)、百里香(Thymus serpyllum)、依蘭(Cananga odorata)等，我們決定以月桂烯會抑制植物的去白化現象當主題，進行更深入的探討。在高一基礎生物與高三選修生物課程中的遺

傳部分，我們學習到DNA的構造與功能與基因表現的過程，並在高二應用生物課程學習到一些生物技術，因此我們想運用所學加以沿伸，探討水稻幼苗去白化現象過程中的分子機制。



圖一、月桂稀(myrcene)抑制水稻的去白化現象

在閱讀高三選修生物中的植物的生殖與生長部分，我們學習到影響植物生長的因素與植物對環境刺激的反應，其中包括植物在逆境下的反應。去白化，即綠化過程(greeding)，是植物常見重要的的生理現象。原本生長在黑暗中的植物照光以後有去白化的現象，如果在這常見的過程中給予刺激，有哪些基因表現會被誘發？我們想以去白化的現象為例，探討VOCs如何影響植物在生理上與基因的表現，進一步驗證在去白化過程可能有哪些基因參與其中，及可能的訊息傳遞途徑。

在學習高二的應用生物課程時，我們發現生物科技正以迅速的節奏進步。生物資料庫的資料量因此暴增，科學家利用網路與生物資訊平台彼此分享大量的資訊。在忙碌的高中生活中，我們也試著想運用生物資訊輔助我們的實驗設計，如此一來可節省許多的時間。我們觀察到相剋化合物月桂烯抑制水稻去白化現象時，便試著利用生物資訊來推測可能影響此生理現象的基因與訊息傳遞之途徑。

在高一基礎生物的生物與環境及高三選修生物中生物多樣性與保育中，我們瞭解環境保育與永續經營的重要，而現今空氣污染日益嚴重，空氣中的小分子物質(例如VOCs)是否影響植物的生長發育？又會影響哪些基因的表現？選修生

物要我們思考如何降低人類活動對與自然環境的污染與危害，我們可否藉由VOCs調控植物的生長與發育，而非使用人工合成的化學物質？民以食為天，現今糧食不足，主要糧食作物的研究變得相當重要。水稻不但是模式植物，且是全世界近一半人口的主食，有七千年的栽種歷史。所以在這次的研究活動中我們採用水稻作為研究材料，探討植物常散發出來的VOCs，以月桂烯為代表，研究如何影響水稻生理上與基因的表現，這不僅是一項很有趣的科學探討，也能思考如何應用植物釋出的VOCs取代化學農藥的方法增加農作物的產量，嘗試用自然的方式，幫助農作物的生長，減少對生物體及自然生態中毒素的累積，因此我們實驗目的如下：

貳、 研究目的

- 一、以月桂烯為例，研究植物散發的小分子有機物質 VOCs 是否影響水稻的生長與發育，並觀察在螢光顯微鏡下葉綠素的分布與電子顯下觀察葉綠體的發育情形。
- 二、學習以生物資訊輔助實驗設計，找出要探討的基因。
- 三、分析月桂烯處理下有差異性表現之基因，針對光合作用與葉綠素生合成之相關基因研究探討。
- 四、進行相關蛋白質以及磷酸化途徑分析。
- 五、了解這些基因參與的生化途徑，試著畫出月桂烯可能抑制水稻幼苗去白化現象的分子機制。
- 六、為保護生態環境及避免人類攝取太多的化學農藥，進一步思考如何以 VOCs 當作氣味天然農藥，取代化學農藥的使用。

參、 研究設備及器材

一、研究材料

(一) 台灣主要糧食作物水稻

水稻在分類上屬於種子植物門 (Phylum Spermatophyta)，被子植物綱 (Class Angiospermae)，單子葉亞綱 (Subclass Monocotyledoneae)，穎花目 (Order Glumiflorae)，禾本科 (Family Gramineae or Poaceae)，稻屬 (Genus *Oryza*)，共有 22 個種 (species)。本實驗使用的水稻(*Oryza sativa*)為台農 67 號(TN67)。

(二) VOCs 的選用：

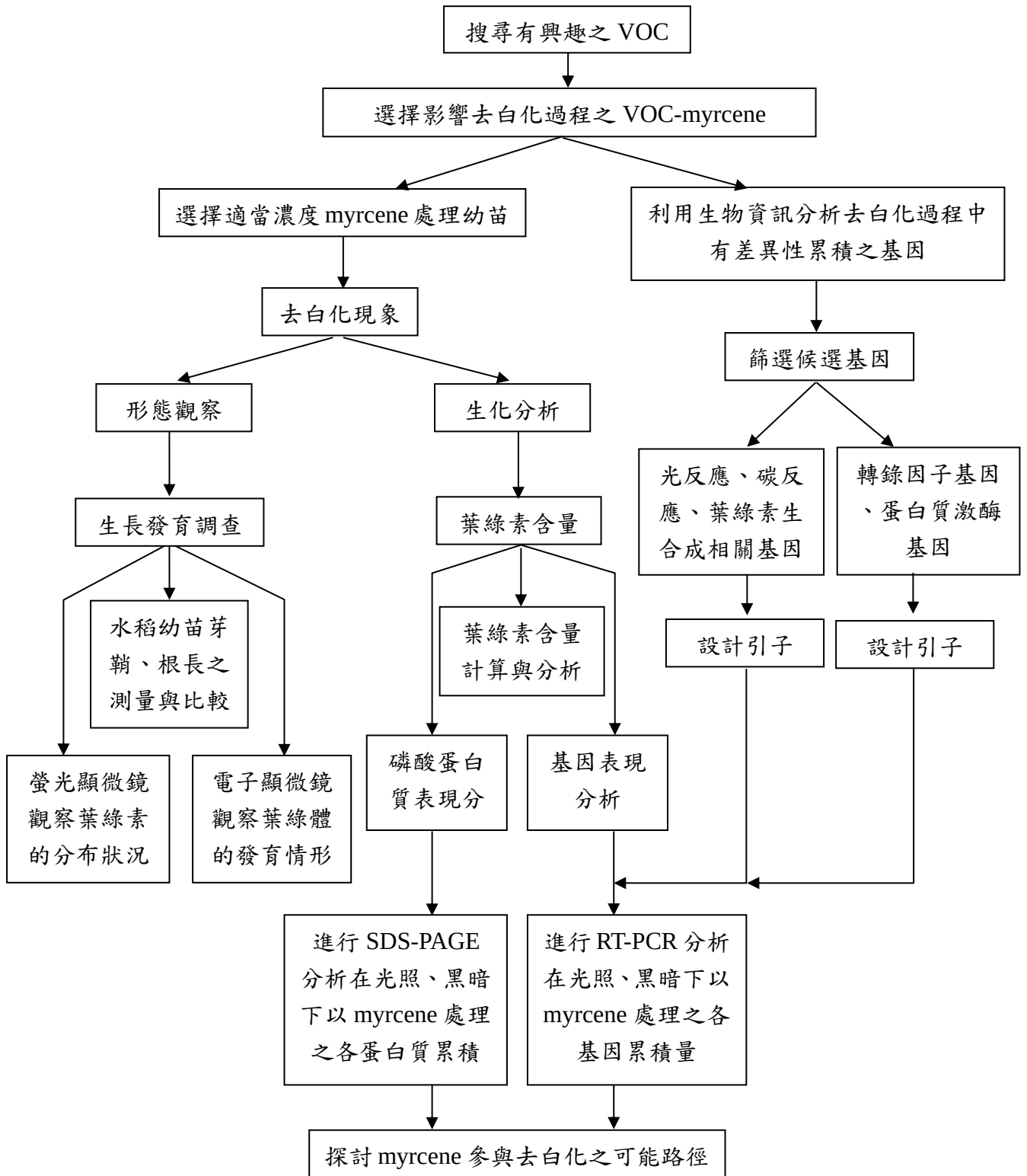
以多數植物會散發出的 **monoterpenes** 物質，月桂烯(myrcene)為代表來研究。

二、研究器材

濾紙(5.5cm、9cm)、培養皿(5.5cm、9cm)、有蓋試管、2.15 L 密閉容器、微量吸取器 (P20、P200、P1000)、微量滴管、洋菜培養箱、鋁箔紙、恆溫培養室(27°C、8.5 klux)、數位相機、電腦軟體(Word、Excel、小畫家)、震盪器、恆溫水浴槽、均質機、離心機、電子天平、鑷子、蒸餾水、丙酮、比色管、液態氮、微量離心管、DNA 電泳及 PCR 相關設備及藥品(詳見研究過程)、蛋白質電泳相關設備及藥品、螢光顯微鏡、穿透式電子顯微鏡(TEM)。

肆、研究過程與方法

一、研究流程圖



二、觀察月桂烯處理下，水稻生長情形

(一) 消毒、播種與催芽

1. 秤取 12 g TN67 水稻種子。
2. 準備有蓋試管，加入 2.5 % NaClO 溶液 30 ml，將種子倒入試管，蓋上蓋子。
3. 將試管放入震盪器中震盪 15 min，消毒種子(如圖二)。



圖二、水稻種子消毒除理

4. 取出試管，將 NaClO 及浮在上面的種子倒出，加蒸餾水(至 45 ml)放入搖擺機中震盪 5 min，清洗種子，重複 3 次。
5. 準備 2 個大培養皿，分別加入 20 ml 的蒸餾水，將種子放入培養皿中，蓋上蓋子置入 37 °C 培養室中於黑暗中，催芽 3 天。

(二) 月桂烯處理

1. 準備 5 個 2.15 公升密閉容器及 10 個 5.5 cm 小培養皿，小培養皿分別放置 10 片濾紙及加入 10 ml 蒸餾水。
2. 挑選培養 3 天已發芽的種子(芽鞘長度不超過 0.3 cm)，分別各移入 6 顆種子至小培養皿中。
3. 以 2 個培養皿一組，移入 2.15 公升密閉容器的上層中(如圖三)。



圖三、於密閉容器中處理月桂烯

4. 準備 5 個小培養皿，分別放置 1 片濾紙。
5. 分別在濾紙上滴入 0 μl (對照組)、50 μl 、100 μl 、200 μl (0 ppm、18.4 ppm、36.8 ppm、73.6 ppm) 的月桂烯，置入 2.15 公升密閉容器下層中，放上種好種子的小培養皿，將蓋子轉緊，避免氣味散發。
6. 將 2.15 公升密閉容器放入培養箱中(如圖四)，用鋁箔紙包住並將培養箱上蓋蓋好，放入 25 $^{\circ}\text{C}$ 培養室中，讓植物在黑暗中生長 3 天。



圖四、黑暗處理之裝置

7. 第 72 hr，將 2.15 公升密閉容器移至照度 8.0 klux，27 $^{\circ}\text{C}$ 培養室中，照光 2.5 hr 後。觀察水稻生長情況。

(三) 檢討與思考：

50 μl 、100 μl 、200 μl (18.4 ppm、36.8 ppm、73.6 ppm) 月桂烯(myrcene) 的處理下，均明顯觀察到 de-etiolation 的現象，決定用更低的濃度的月桂烯處理水稻，模擬更接近大自然環下進行觀察，因此設以下實驗。

三、觀察低濃度的月桂烯處理下，水稻生長情形

(一) 實驗步驟同上，但月桂烯濃度降低，分別在濾紙上滴入 0 μ l (對照組)、2.5 μ l、5 μ l、10 μ l、20 μ l (0 ppm、0.92 ppm、1.84 ppm、3.68 ppm、7.36 ppm) 的月桂烯。

(二) 檢討與思考：

低濃度的月桂烯處理水稻時對植物去白化的現象仍然有影響，我們決定用 10 μ l (3.68 ppm) 的月桂烯。為了進一步想探討月桂烯處理對水稻之生理現象的影響，因此設以下實驗。

四、分析月桂烯處理下，水稻之葉綠素含量

(一) 催芽與月桂烯處理

1. 催芽步驟如上。
2. 準備 8 個 2.15 公升密閉容器及 24 個 5.5 cm 小培養皿，小培養皿分別放置 10 片濾紙及加入 10 ml 過濾水。
3. 挑選培養 3 天已發芽的種子，分別各移入 6 顆種子至小培養皿中，將 3 個一組移入兩公升密閉容器的上層中。
4. 以 0 μ l、10 μ l (0 ppm、3.68 ppm) 月桂烯處理。其餘實驗步驟同上。
5. 本實驗分兩組，一組讓植物在黑暗中生長，另一組分別在第 48 hr 及第 72 hr，將 2.15 公升密閉容器移至照度 8.0 klux，27 $^{\circ}$ C 培養室中，照光 2.5 hr 及 25 hr 後，分別測量其葉綠素累積量。

(二) 葉綠素萃取

1. 取 0.05 g 植物組織，加入 1 ml 80 % 丙酮，接著利用均質機將組織搗碎，並放入 1.5 ml 的離心管。
2. 13200 rpm，4°C，離心 10 min。
3. 吸取上清液至比色管中，並測量波長 663.6 nm、646.6 nm 之下吸光值。
4. 將吸光值與植物鮮重套入公式(見附錄二)，計算葉綠素含量。

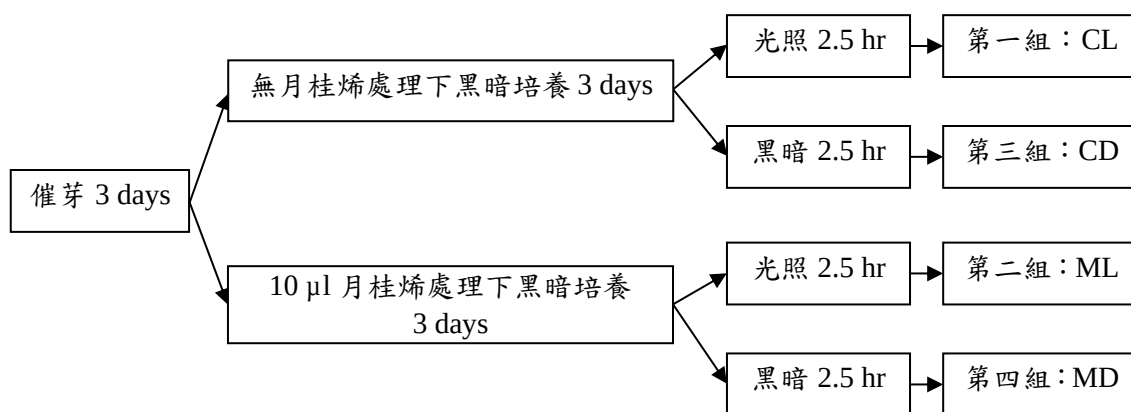
五、觀察月桂烯(myrcene)處理下，水稻去白化現象：

以觀察去水稻的去白化現象為例，進一步在分子層面探討月桂烯處理水稻，對水稻基因產物累積量的影響。

(一) 催芽將步驟如上。

(二) 月桂烯及不同光照處理水稻

1. 準備 4 個 2.15 公升密閉容器及 12 個 5.5 cm 小培養皿，小培養皿分別放置 10 片濾紙及加入 10ml 過濾水。
2. 挑選培養 3 天已發芽的種子，分別各移入 6 顆種子至小培養皿中，將 3 個一組移入 2.15 公升密閉容器的上層中。
3. 以 0 μ l、10 μ l (0 ppm、3.68 ppm)月桂烯處理。其餘實驗步驟同上。
4. 本實驗共分為四組，其中兩組不加月桂烯黑暗培養三日後，分別處理光照或黑暗 2.5 hr；另兩組以月桂烯處理並黑暗培養三日後，分別處理光照或黑暗 2.5 hr。



(三) 同樣以上做法，但其中兩組不加月桂烯黑暗培養三日後，分別處理光照或黑暗 25 hr。

六、以螢光顯微鏡觀察月桂烯(myrcene)處理下，芽鞘中的葉綠素分布

(一) 催芽及水稻培養方法如上。

(二) 黑暗下將幼苗分為兩群，以 0 μ l、10 μ l (0 ppm、3.68 ppm)月桂烯處理三日後，將幼苗分為十二組，處理不同長度的光照或黑暗：

1. 第一組至第四組，別處理光照或黑暗 2.5 hr。

	第一組	第二組	第三組	第四組
月桂烯	-	+	-	+
光照	光照 2.5 hr	光照 2.5 hr	持續黑暗 2.5 hr	持續黑暗 2.5 hr
組別代號	CL-2.5	ML-2.5	CD-2.5	MD-2.5

2. 第五組至第八組，分別處理光照或黑暗 12.5 hr。

	第五組	第六組	第七組	第八組
月桂烯	-	+	-	+
光照	光照 12.5 hr	光照 12.5 hr	持續黑暗 12.5 hr	持續黑暗 12.5 hr
組別代號	CL-12.5	ML-12.5	CD-12.5	MD-12.5

3. 第九組至第十二組，分別處理光照或黑暗 25 hr。

	第九組	第十組	第十一組	第十二組
月桂烯	-	+	-	+
光照	光照 25 hr	光照 25 hr	持續黑暗 25 hr	持續黑暗 25 hr
組別代號	CL-25	ML-25	CD-25	MD-25

(三) 取以上各組的芽鞘放置於螢光顯微鏡下，將視野放大 400 倍，分別在白
光及 UV 光照射下觀察及拍照。UV 光下可觀察到葉綠體內之葉綠素所發
出的紅色螢光。

七、以穿透式顯微鏡(TEM)觀察月桂烯(myrcene)處理下，芽鞘中的葉綠體的發育情
形

(一) 催芽及水稻培養方法如上。

(二) 固定與包埋步驟如下：

1. 水稻芽鞘處理完後剪下
2. 固定在 2.5% glutaraldehyde
3. 鉞酸固定，接著會脫水、滲樹脂
4. 包埋與聚合。

(三) 製作超薄切片與染色，估計上 TEM 觀察需 3 週

八、以 RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)進行基因累積量
半定量分析

(一) RNA 抽取 (RNeasy Plant Mini Kits, QIAGEN, Hilden, Germany)

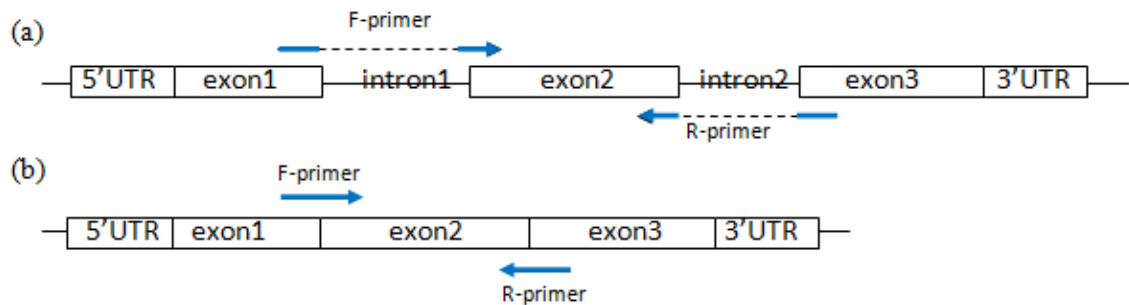
1. 剪下水稻芽鞘在液態氮中磨成粉，取約 1 g 將之磨碎，取出約 0.15 g
粉末於微量離心管中，並在粉末未解凍前加入 450 μ l RLT buffer (1
% β -mercaptoethanol)，劇烈震盪使粉末均勻懸浮在緩衝液中。
2. 以透氣膠帶封好管口，置於 56 $^{\circ}$ C 水浴槽中 1 min，使細胞裂解。
3. 將裂解後的溶液全部吸至 QIAshredder spin column，以 16000 x g 離
心 2 min。

4. 吸取 collection tube 中的上清液，加入一半體積(約 225 μ l)之酒精 (96~100 %)，快速混合均勻，再轉移至 RNeasy mini spin column 中，以 16000 x g 離心 15 sec。
5. 倒掉濾液並加入 700 μ l RW1 buffer 於 RNeasy mini spin column 中，靜置 5 min 後，以 16000 x g 離心 15 sec。
6. 將 RNeasy mini spin column 置於 collection tube 中，加入 500 μ l RPE buffer 後，以 16000 x g 離心 15 sec。
7. 倒掉濾液再加 500 μ l RPE buffer，以 16000 x g 離心 2 min，使 RNeasy membrane 乾燥。
8. 將 RNeasy mini spin column 置於新的微量離心管中，以 16000 x g 離心 1 min 去除殘存的酒精。
9. 將 RNeasy mini spin column 置於新的微量離心管中，加入 30 μ l DEPC 水(diethyl pyrocarbonate-treated water)將 RNA 溶解，靜置 5 min。
10. 以 16000 x g 離心 2 min 收集 RNA。
11. 重覆步驟 9 與步驟 10，純化 RNA 後，置於-70 $^{\circ}$ C 冰箱中儲存。

(二) Primers 的設計：gDNA $\rightarrow$ cDNA $\rightarrow$ 胺基酸

1. 參考前人的研究 (Hamamoto, K., 2011)，找出九個很可能影響去白化的九個基因。
2. 利用 NCBI 網站找出這九個基因的全部序列。
3. 再利用 NCBI 網站找出九個 gDNA 相對的 cDNA 序列。

4. 為了確定目標基因序列，我們從 cDNA 密碼子中找出相對的胺基酸序列。(附錄 1)
5. 抽 RNA 時，可能會參雜一些 gDNA，進行 PCR 時為了避免同時放大出 gDNA，我們不利用電腦幫我們設計 primers，而從 cDNA 與 gDNA 之序列差異設計 primers。
6. 本實驗以約 20 nucleobases 作為設計 primers 的長度，primers 的序列必須跨越兩個 exon (exon-exon junction)，以確保 PCR 產物來自於 cDNA 而非 gDNA(如圖五)，此外 GC 含量設定在 50 % 左右，primers T_m 值設定介於 50~60 °C，並利用軟體檢查並挑選較少二級結構的 primers，最後利用 NCBI 網站上的 primers BLAST 檢查 primers 的專一程度。



圖五、Primers 所放大之序列在基因中的相對位置

圖中藍色線條為 primers 序列，虛線為 primers 無法配對之序列。

- (a)gDNA 序列與 primers 之相對位置：primers 因無法與 intron 配對而不會放大 genomic DNA。(b)cDNA 序列與 primers 之相對位置：primers 可與 cDNA 配對，並放大 cDNA 序列。

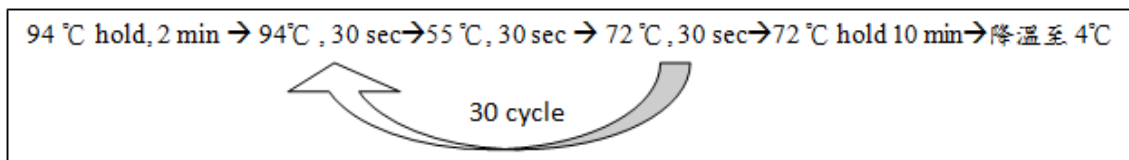
(三) cDNA 合成

1. 分別取 2 μ l RNA (1 μ l)；1 μ l oligo dT；7.8 μ l 無菌水，加至 0.2 ml 離心管。
2. 利用 PCR 機器進行反應，設定條件為 70 °C 反應 5 min。

3. 立即將離心管置於冰上，使其冷卻，至少冷卻 5 min 以上。
4. 準備如下的試劑：4 μ l ImProm-II 5 X reaction buffer；3.2 μ l $MgCl_2$ ；1 μ l dNTP；1 μ l Improm-II reverse transcriptase。
5. 將步驟 4 中準備好的試劑，加至含步驟 1 的離心管中。
6. 利用 PCR 機器進行實驗，設定條件為 25 $^{\circ}C$ 反應 5 min，42 $^{\circ}C$ 反應 1 hr，70 $^{\circ}C$ 反應 15 min。
7. 將製備好的 cDNA 存放 -20 $^{\circ}C$ 冰箱中備用。

(四) 以 RT-PCR 進行基因累積之半定量

不同處理下基因累積量之差異可藉由 RT-PCR 進行半定量分析。我們取 2 μ l 的 cDNA(100 ng)與 10 μ l 2 X PCR mix (prompga)、4 μ l F-primer、4 μ l R-primer 混合均勻，並以下列條件進行 PCR。



(五) DNA 電泳

取 10 μ l PCR product 置於 2 % 電泳膠體(agarose gel)中，利用 85 V 進行 20 min 電泳，再利用 EtBr 進行染色，並在紫外燈下觀察結果。

九、探討分子機制，進行轉錄因子(transcription factor, TF)與蛋白質激酶(protein kinase, PK)的研究

(一) 利用前人的研究(Hamamoto K., 2011)，將水稻在黑暗中與光照處理下，基因累積量有顯著差異的基因找出來。

(二) 將基因累積量在黑暗與光照下差異性較大之基因進行分類，以找出參與光合作用光反應、暗反應及葉綠素合成相關的轉錄因子。

(三) 選出其中表現量差異較大的六個轉錄因子來探討。

(四) 利用生物資訊分析此六個轉錄因子中，哪些可能在去白化過程中會被月桂烯所調控。

(五) 找出五個蛋白質激酶，進行更上游的訊息傳遞途徑探討。

十、進行蛋白質分析

採用不連續膠體電泳方法 (SDS-PAGE)，用不同染劑染色，偵測一般蛋白質與磷酸化蛋白質。

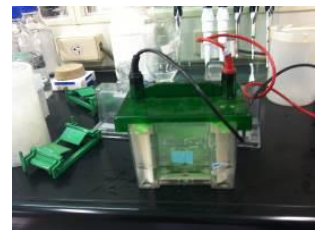
(一) 催芽及水稻培養方法如上。

(二) 蛋白質萃取：

1. 取 0.1 克的植物組織利用均質機粉碎。
2. 加入 200ul 蛋白質萃取溶液(50mM Tris-HCl pH=7.4, 250mM sucrose, 10mM Na₃VO₄, 10mM NaF, 1mM Na-tartrate, 10% glycerol, 50mM Na₂S₂O₅, 1%SDS)均勻震盪。
3. 16,000g 離心力常溫離心 10 分鐘。
4. 取上清液利用 Bio-Rad Dc protein assay 定量。
5. 將蛋白質與 loading dye 1:1 混合(62.5mM Tris-HCl pH=6.8, 2% SDS, 5% B-ME, 10% Glycerol, 0.1% Bromophenol)。

(三) 蛋白質電泳：

1. 準備一組鑄膠器，準備 SDS 膠體溶液 (如附錄六)
2. 取下齒模即可進行電泳。
3. 待追蹤染料泳動到底



邊，中止電泳。

(四) 膠體染色：

1. 偵測一般蛋白時

- (1) 將蛋白質膠片用 100ml 蒸餾水清洗三次,每次 10 分鐘
- (2) 經蛋白質膠片泡入 100ml 的 Coomassie blue 溶液(0.1% Coomassie blue, 40%MeOH, 10%HOAc)16 小時以上
- (3) 利用 Destain 溶液(10%HOAc, 40%EtOH)退色

2. 鑽石染偵測磷酸化蛋白

- (1) 17.5ug 的蛋白質利用上膠 4.5%,下膠 10%,4 度下進行 SDS-PAGE 蛋白質電泳,電壓 80V 30 分鐘,接著再轉成 120V 90 分鐘
- (2) 電泳進行完畢利用 100ml 蒸餾水清洗兩次,每次 10 分鐘
- (3) 利用 100ml Fix 溶液(50%methanol,10%acetic acid)清洗兩次,每次 30 分鐘
- (4) 利用 100ml 蒸餾水清洗三次,每次 10 分鐘
- (5) 倒掉蒸餾水,加入 60ml Pro-Q Diamond stain 染色 90 分鐘
- (6) 加入 100ml Destain 溶液(20% acetonitrile, 50mM sodium acetate, pH=4)清洗三次,每次 30 分鐘
- (7) 加入 100ml 蒸餾水清洗兩次,每次 5 分鐘
- (8) 利用 580nm 波長的光激發,在看片箱內觀看結果

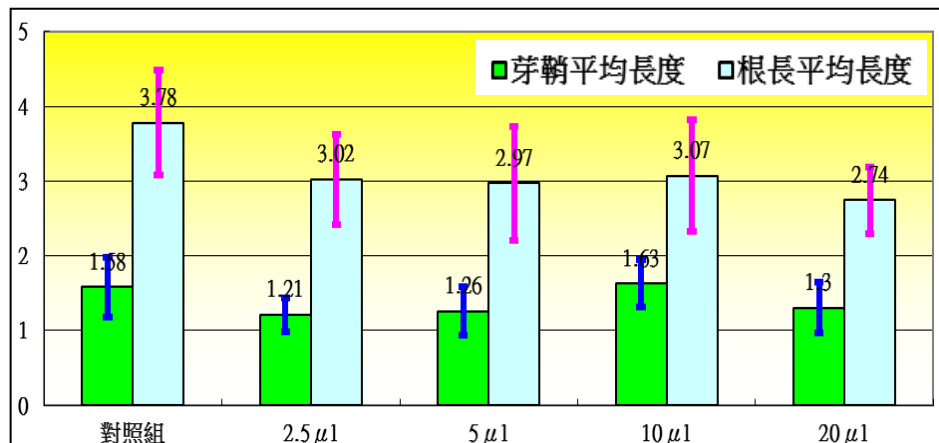
伍、 研究結果

一、月桂烯(myrcene)對水稻生長與發育的影響

測量不同濃度月桂烯處理下，水稻幼苗之芽鞘及根長度的差異，以了解月桂烯對水稻生長發育的影響。

表一、月桂烯處理下水稻生長狀況(測三次平均)

月桂烯	0 μl	2.5 μl	5 μl	10 μl	20 μl
幼鞘(cm)	1.58	1.21	1.26	1.63	1.30
根長(cm)	3.78	3.02	2.97	3.07	2.74



圖六、月桂烯處理下水稻生長狀況

(一) 植物相剋物質月桂烯可稍微抑制水稻幼苗根的生長，10 μl 月桂烯可抑制水稻幼根長度約對照組的 72%。(如表一、圖六)

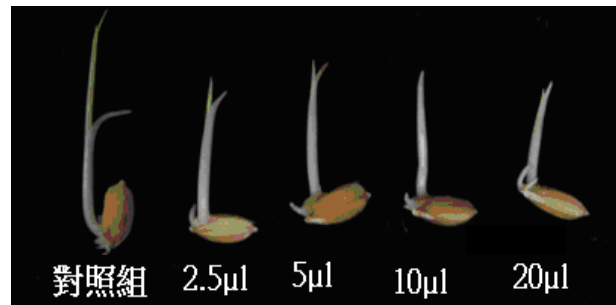
(二) 月桂烯對水稻芽鞘生長的影響，並不像抑制水稻幼苗根的生長這麼有規律，有時甚至覺得沒什麼差別。

(三) 照光後明顯觀察到月桂烯可抑制水稻芽鞘去白化現象。

二、月桂烯對水稻的葉綠素合成之影響

(一) 觀察月桂烯對水稻幼苗去白化的影響

經過不同濃度的月桂烯處理後三天後，觀察其型態差異，可明顯觀察到水稻幼苗的去白化現象受到抑制(如圖七)。



圖七、以不同濃度月桂烯處理水稻，觀察芽鞘去白化現象之差異

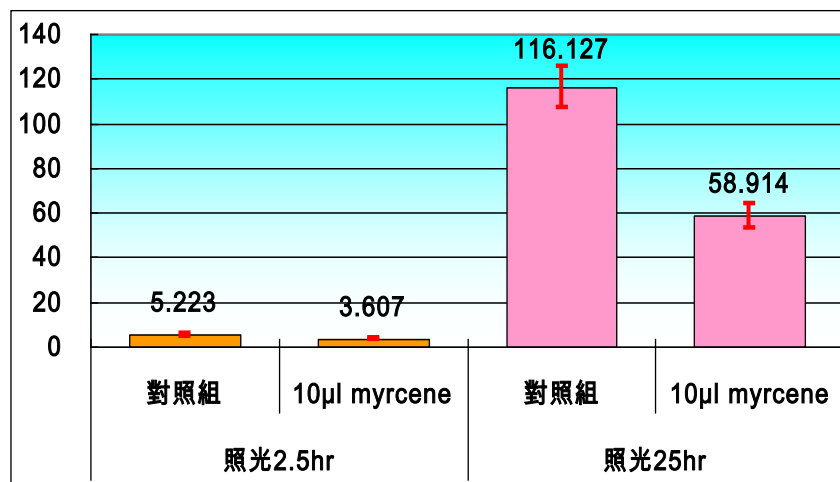
(二) 分析月桂烯對水稻幼苗的葉綠素生合成的影響

月桂烯處理水稻並在黑暗中生長三天後，再照光 2.5 hr，萃取葉綠素進行分析，實驗組所合成的總葉綠素含量與對照組相比，降低了三成。

同樣的方法，我們以月桂烯處理水稻並在黑暗中培養三天後，再照光 25hr，分析實驗組所合成的總葉綠素含量約為對照組的一半。(如表二、圖八)。

表二、月桂烯對水稻抑制去白化的現象(測兩次平均)

以月桂烯處理水稻之葉綠素含量	照光 2.5 hr 後		照光 25 hr 後	
	對照組	10 µl 月桂烯	對照組	10 µl 月桂烯
總葉綠素(mg)	5.223	3.607	116.127	58.914
總葉綠素/對照組	1.000	0.691	1.000	0.507



圖八、以 10 µl 月桂烯處理下水稻之葉綠素含量(mg)

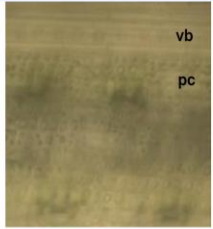
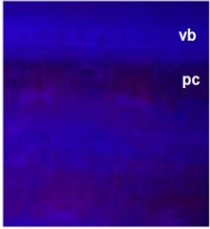
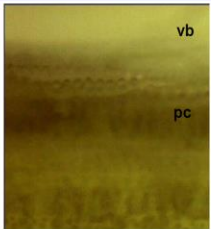
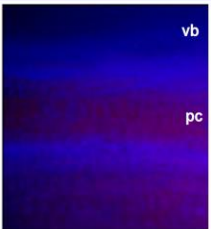
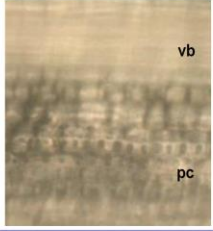
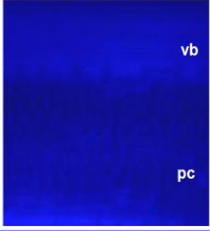
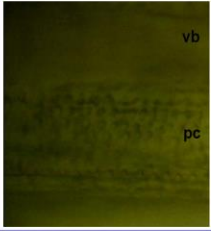
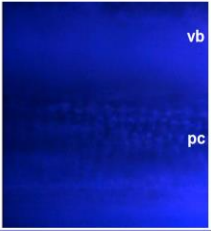
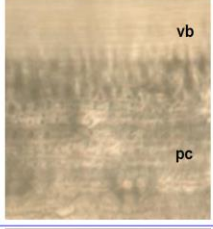
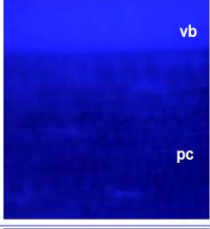
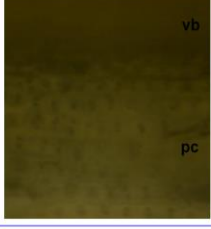
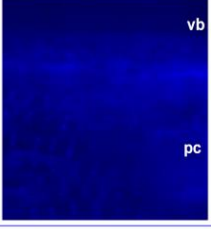
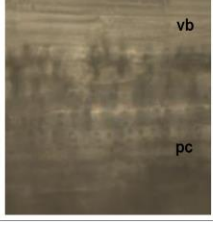
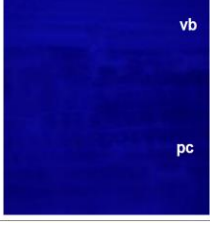
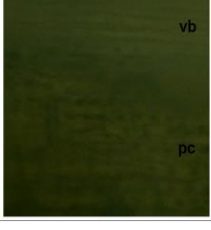
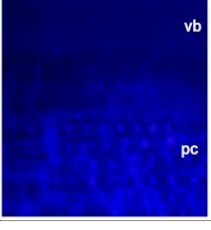
(三) 觀察月桂烯對水稻幼苗芽鞘細胞中葉綠素分布狀況的影響

在螢光顯微鏡下觀察經過不同光照時間與月桂烯處理下，芽鞘細胞中的葉綠素分布狀況，分別在白光與 UV 光照射下拍攝影像。無月桂烯處理之對照組與月桂烯處理之水稻經照光 2.5 小時後(CL-2.5、ML-2.5)，在顯微鏡下以白光照射均無法明顯看出葉綠素分布，但在 UV 光照射下，CL-2.5 可觀察到數個紅色螢光點，顯示經照光 2.5 小時後，對照組已合成少量葉綠素；而 ML-2.5 在視野下僅觀察到少數紅色螢光點，顯示經照光 2.5 小時後，月桂烯處理之水稻僅生合成少量葉綠素。由於經拍照後效果不如直接在顯微鏡下觀察的清楚，紅色螢光點不易呈現，因此附圖並未呈現於本研究報告書中。

無月桂烯處理之對照組經照光 12.5 及 25 小時後(CL-12.5 及 CL-25)，在顯微鏡下以白光照射可觀察到葉綠素在芽鞘細胞中的分布，而 UV 光照射下亦呈現非常明顯的紅色螢光，顯示經照光 12.5 及 25 小時後，對照組已生合成大量葉綠素；而月桂烯處理之水稻經照光 12.5 及 25 小時後(ML-12.5 及 ML-25)，則幾乎無法偵測葉綠素的分布。此外，無論有無月桂烯之處理，持續黑暗處理 12.5 小時(CD-12.5 及 CD-25、MD-12.5 及 ML25)，均無法偵測葉綠素的分布(表三)。

表三、月桂烯處理下經不同長度的光照或黑暗後，葉綠素的分布狀況

vb,vascular bundles; pc, parenchyma cells

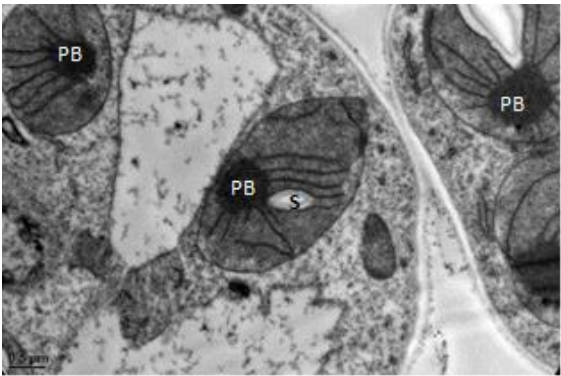
	白光	UV 光		白光	UV 光
CL-12.5			CL-25		
ML-12.5			ML-25		
CD-12.5			CD-25		
MD-12.5			MD-25		

(四) 觀察月桂烯處理下水稻幼苗芽鞘細胞中葉綠體發育的影響

在穿透式電子顯微鏡(TEM)下觀察經過不同光照時間與月桂烯處理下，芽鞘細胞中的葉綠體發育狀況。經照光 12.5 小時後(CL-12.5 與 ML-12.5)，在顯微鏡下可觀察到類囊體(thylakoid)與葉綠餅(granum)開始發育，但無月桂烯處理的對照組(CL-12.5)的類囊體發育較好，葉綠餅開始發育且面積較 ML-12.5 大。黑暗處理 12.5 小時後(CD-12.5 與 MD-12.5)，顯微鏡下看不見葉綠餅的發育，且原片層體(prolamellar body)都很明顯，還沒消失。我們很驚奇地發現，照光會刺激葉綠體的發育，而月桂烯會抑制類囊體與葉綠餅的發育階段。

表四、月桂烯處理下經不同長度的光照或黑暗後，葉綠體的發育狀況

PB, prolamellar body; G, granum; T, thylakoid; S, starch grain

CL-12.5	ML-12.5
	
CD-12.5	MD-12.5
	

三、月桂烯對去白化(綠化)的分子機制

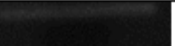
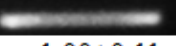
(一) 運用生物資訊找出可能跟去白化有關的基因

根據前人的研究，並運用生物資訊分析，挑選出九個可能參與去白化路徑的基因。包含與光合作用光反應有關的四個基因：*Psbs*、*ISP*、*FNR*、*ATPS*；與光合作用碳反應有關的三個基因：*CA*、*RCA*、*G3PD*；與葉綠素合成有關的兩個基因：*ACSF*、*LPOR*。表四為針對各基因 gDNA 與 cDNA 所設計之引子(引子與 gDNA、cDNA 之關係詳見附錄二)。

表五、九個參與光合作用，葉綠素生合成之 gene 的引子

gene	primer name	sequence	length	CG %	AT %	Tm =4 °C (G + C) + 2 °C (A + T)		product size
Os07g0513000	ATPS-F	ATCGAGGAGCTCAAGCAGCT	20	0.55	0.45	62	60.23	898
	ATPS-R	GCTTGACATTGGCATCGC	20	0.5	0.5	60	60.07	
	G3PD-F	TCCAAGCAGAGGGTGGACTT	20	0.55	0.45	62	60.6	458
Os03g0129300	G3PD-R	CCGGTACCCTCGATGACAAT	20	0.55	0.45	62	60.55	
	CA-F	GAGTTCTATGACAAGAAGCCGGA	23	0.48	0.52	68.08	60.55	432
Os01g0639900	CA-R	CACGGCCTCCTTCTCCAA	18	0.61	0.39	57.96	60.73	
	RCA-F	GGGATCAACCCCATCATGA	19	0.58	0.42	60.04	59.91	492
Os11g0707000	RCA-R	GCCGAAGAAATCGATGGATT	20	0.45	0.55	58	59.83	
	ACSF-F	GCAGGCTCAAGAAAACAAACC	21	0.48	0.52	62.16	59.7	515
Os01g0279100	ACSF-R	TGTGCGGTTGGTCTCAATTATC	22	0.45	0.55	63.8	60.69	
	LPOR-F	CTGTCCCCAAGAAGGGTAACTT	22	0.5	0.5	66	59.35	1023
Os04g0678700	LPOR-R	AGTCCTTGTTCCAGCTCCAGTAC	23	0.52	0.48	69.92	59.65	
	Psbs-F	CAAGAAAGGCTGAGCCGAA	19	0.53	0.47	58.14	60.04	651
Os01g0869800	Psbs-R	CGAAACCTCGGTAGATCGATC	21	0.52	0.48	63.84	59.51	
	ISP-F	CTACTCAGCTGTGCAGGTCT	19	0.63	0.37	61.94	59.8	518
Os07g0556200	ISP-R	CCTGCCCTGGTTGTTGTACT	18	0.61	0.39	57.96	60.76	
	FNR-F	CCAAGACCGTTTCACTCTGC	20	0.55	0.45	62	59.28	565
Os06g0107700	FNR-R	CAGTCGATTCCATCTTTTGCA	21	0.43	0.57	60.06	59.65	

(二) 以 RT-PCR 測基因累積量，觀察月桂烯抑制去白化的現象

處理方式	第一組	第二組	第三組	第四組
	CL(control light)	ML (myrcene light)	CD(control dark)	MD (myrcene dark)
<i>ATPS</i> ^(☆)	 1.00±0.64	 0.85±0.65	 0.55±0.39	 0.25±0.21
<i>FNR</i> ^(☆)	 1.00±0.03	 0.45±0.25	 0.33±0.17	 0.21±0.19
<i>ISP</i> ^(☆)	 1.00±0.21	 0.41±0.32	 0.10±0.07	 0.00±0.00
<i>RCA</i> ^(★)	 1.00±0.62	 0.39±0.13	 0.00±0.00	 0.00±0.00
<i>G3PD</i> ^(★)	 1.00±0.11	 0.48±0.12	 0.10±0.12	 0.09±0.10
<i>ACSF</i> ^(⊕)	 1.00±0.36	 0.68±0.41	 0.26±0.14	 0.15±0.02
<i>α-TUB</i>	 1.00±0.00	 1.00±0.00	 1.00±0.00	 1.00±0.00

圖九、光照與月桂烯影響光合作用及葉綠素合成相關之基因表現

以 *α-TUB* 作為對照，比較光照有無與月桂烯處理下之各基因表現情形。CL：無月桂烯下培養三日後光照 2.5 hr；ML：以月桂烯處理三日後照光 2.5 hr；CD：無月桂烯下培養三日後持續 2.5 hr 黑暗；MD：以月桂烯處理三日後持續 2.5 hr 黑暗。^(☆)為參與光反應之基因；^(★)為參與碳反應之基因；^(⊕)為參與葉綠素生合成之基因。我們也測 *LPOR*^(⊕) 基因，但 PCR 的產物，分子量不是我們要的。*Psbs*^(☆) 基因電泳的結果找不到產物。

表六、月桂烯抑制去白化的現象之比較分析

CL：無月桂烯下培養三日後光照 2.5 hr；ML：以月桂烯處理三日後照光 2.5 hr；CD：無月桂烯下培養三日後持續 2.5 hr 黑暗；MD：以月桂烯處理三日後持續 2.5 hr 黑暗。^(☆)為參與光反應之基因；^(★)為參與碳反應之基因；^(⊕)為參與葉綠素生合成之基因。

	CL	ML	CD	MD	ML / CL	MD / CD
<i>ATPS</i> ^(☆)	1.00	0.85	0.55	0.25	0.85	0.45
<i>FNR</i> ^(☆)	1.00	0.45	0.33	0.21	0.45	0.64
<i>ISP</i> ^(☆)	1.00	0.41	0.10	0.00	0.41	0.00
<i>RCA</i> ^(★)	1.00	0.39	0.00	0.00	0.39	☆
<i>G3PD</i> ^(★)	1.00	0.48	0.10	0.09	0.48	0.90
<i>ACSF</i> ^(⊕)	1.00	0.68	0.26	0.15	0.68	0.58
<i>α-TUB</i>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

(三) 分析去白化過程中受月桂烯調控之光合作用之相關基因累積模式

1. 葉綠素生合成之基因 *ACSF* 累積量受月桂烯抑制約三成，與總葉綠素量被月桂烯抑制之比例是相似的。
2. 光合作用中碳反應所需基因 *RCA*、*G3PD*，與光反應所需基因 *ISP* 在暗處幾乎無表現，而在照光後基因累積量則顯著受月桂烯抑制。
3. 光合作用中參與光反應之基因 *FNR* 在暗處之表現量已被抑制，且在照光過程中此基因累積速率亦顯著受月桂烯抑制。
4. 光合作用中光反應所需基因 *ATPS* 在暗處之表現量已被抑制，但照光過程中基因累積速率可被月桂烯促進，然最後在照光後之累積量仍受月桂烯抑制約 1~2 成。

(四) 將水稻在黑暗中與光亮處理下，基因累積量有顯著差異的轉錄因子找出來，選出其中表現量差異較大的六個轉錄因子來探討(表六)。由轉錄因子 *MYB-TF1* 的基因表現量可以看出與 *RCA* 基因表現類似，*RCA*、*MYB-TF1* 在黑暗中幾乎不表現，光照後誘發基因產物之累積，且誘發程度會大量被月桂烯抑制 (*MYB-TF1*: $ML / CL = 0.52$; *RCA*: $ML / CL = 0.39$)(圖十)，可見 *RCA* 為其下游基因。

表七、光照後具有差異性表現的轉錄因子基因

將光照與黑暗下基因表現量進行雙尾 T 檢定得到 P-VALUE。將光照與黑暗下基因表現量之比值取對數得到 LOG-RATIO。篩選表現量差異大與 p-value 小的六個轉錄因子基因進行研究分析。

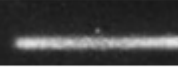
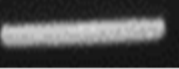
Locus	Annotation	Seedling, W vs. D				Family
		W Light	D	P-VALUE	LOG-RATIO	
MYB-TF1 (Os01g0635200)	MYB family transcription factor, putative, expressed	557.321	98.500	0.194	2.500	MYB_related; from: TIGR6.1
bHLH-TF2 (Os02g0691500)	helix-loop-helix DNA-binding protein, putative, expressed	418.153	83.667	0.013	2.321	bHLH; from: TIGR6.1
LBD-TF3 (Os01g0825000)	DUF260 domain containing protein, putative, expressed	341.727	70.500	0.099	2.277	LBD; from: TIGR6.1
ERF-TF4 (Os03g0860100)	AP2 domain containing protein, expressed	566.457	122.000	0.000	2.215	ERF; from: TIGR6.1
COL-TF5 (Os02g0731700)	CCT/B-box zinc finger protein, putative, expressed	427.233	93.500	0.026	2.192	CO-like; from: TIGR6.1
MIKC-TF6 (Os10g0536100)	OsMADS56 - MADS-box family gene with MIKCc type-box, expressed	630.115	143.000	0.027	2.140	MIKC; from: TIGR6.1

處理方式	第一組	第二組	第三組	第四組
	CL(control light)	ML (myrcene light)	CD(control dark)	MD (myrcene dark)
<i>MYB-TF1</i>	 1.00±0.10	 0.52±0.50	 0.00±0.00	 0.00±0.00
<i>bHLH-TF2</i>				
<i>ERF-TF4</i>				
<i>MIKC-TF6</i>				
<i>α-TUB</i>				

圖十、光照與月桂烯影響轉錄因子基因的表現

CL：無月桂烯下培養三日後光照 2.5 hr；ML：以月桂烯處理三日後照光 2.5 hr；
CD：無月桂烯下培養三日後持續 2.5 hr 黑暗；MD：以月桂烯處理三日後持續 2.5 hr 黑暗。

(五) 進行更上游的訊息傳遞途徑之蛋白質激酶(PK)的探討，選擇五個 kinase 基因，分析其與月桂烯之間的關係。實驗結果得知蛋白質激酶的基因表現與我們要探討的基因表現模式並不相同(圖十一)。

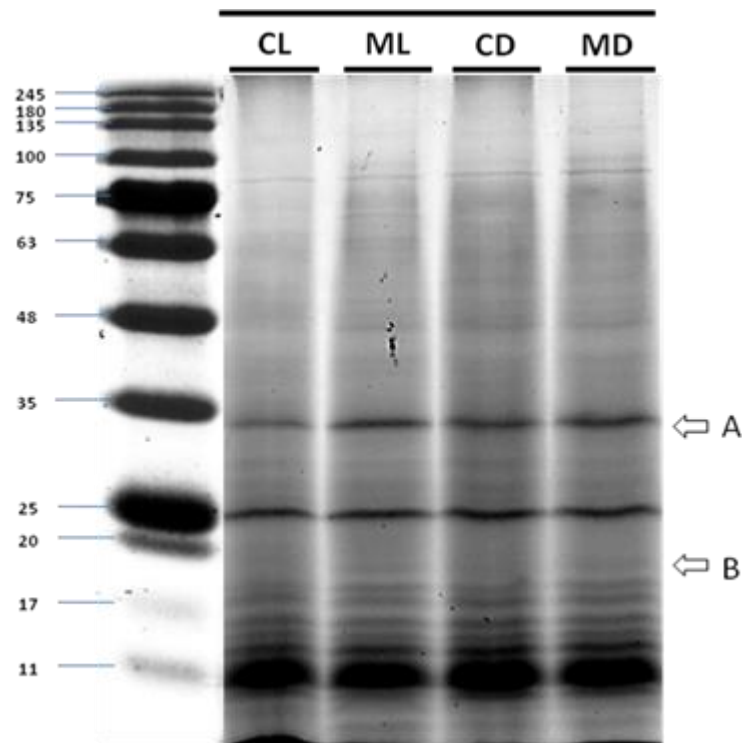
處理方式	第一組	第二組	第三組	第四組
	CL(control light)	ML (myrcene light)	CD(control dark)	MD (myrcene dark)
<i>Kinase 1</i>				
<i>Kinase 2</i>				
<i>Kinase 3</i>				
<i>Kinase 4</i>				
	1.00±0.10	0.68±0.31	0.12±0.16	0.07±0.11
<i>Kinase 5</i>				
<i>α-TUB</i>				

圖十一、光照與月桂烯影響蛋白質基酶基因的表現

CL：無月桂烯下培養三日後光照 2.5 hr；ML：以月桂烯處理三日後照光 2.5 hr；CD：無月桂烯下培養三日後持續 2.5 hr 黑暗；MD：以月桂烯處理三日後持續 2.5 hr 黑暗。

(六) 月桂烯處理下目標蛋白質與磷酸化蛋白質的分析

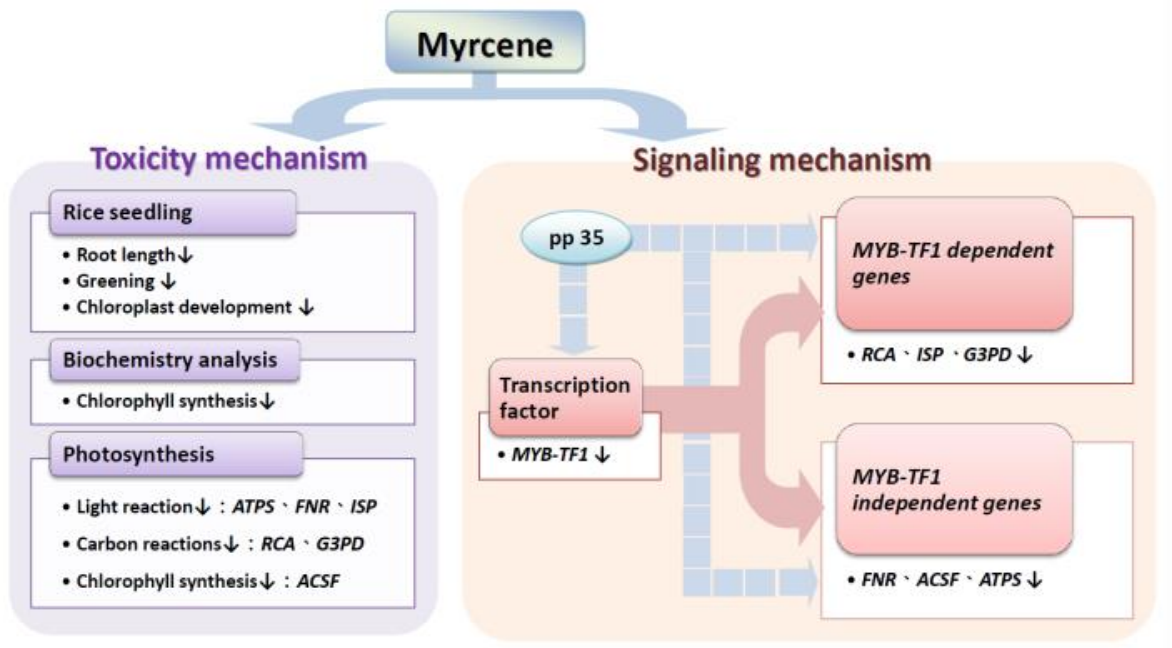
我們進一步分析轉譯後修飾。經過不同光照時間與月桂烯處理 12.5 小時下，偵測磷酸化蛋白質差異。首先以不連續膠體電泳方法(SDS-PAGE)分離蛋白質，接著以鑽石染真測磷化之差異性。分析後可發現 35 kD 的 phosphoprotein (pp35)在照光後發生去磷酸化，造成染色結果較黑暗組淡，而月桂烯處理會抑制此蛋白質照光後的去磷酸化(圖十二 A)，這暗示 pp35 可能參與月桂烯抑制水稻去白化現象。另外，我們也發現一個 18kD 的未知蛋白質(pp18)經過月桂烯處理後可被偵測，顯示此蛋白質經月桂烯處理後會發生磷酸化，且無論光照與否並不影響此蛋白質累積量，顯示此蛋白質之磷酸化不受光照所影響(圖十二 B)。



圖十二、光照與月桂烯處理影響蛋白質磷酸化

利用鑽石染偵測磷酸化蛋白。箭頭 A 所指之蛋白質 pp35 在光照後去磷酸化，箭頭 B 所指之蛋白質 pp18 在月桂烯處理後磷酸化。CL：無桂烯下培養三日後光照 12.5 hr；ML：以月桂烯處理三日後照光 12.5 hr；CD：無月桂烯下培養三日後持續 12.5 hr 黑暗；MD：以月桂烯處理三日後持續 12.5 hr 黑暗。

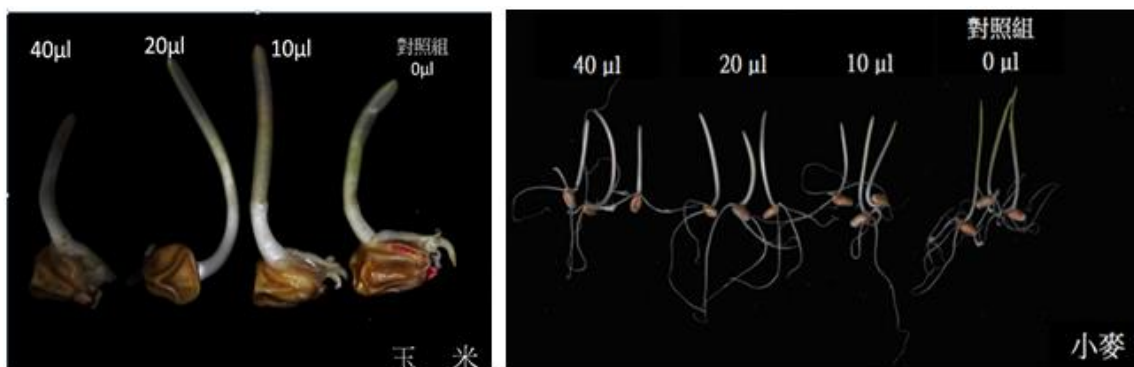
(七) 繪製月桂烯抑制水稻生長發育、生化合成及訊息傳遞之機制圖



圖十三、月桂烯抑制去白化作用及訊息傳遞途徑

四、觀察月桂烯對其他植物去白化現象的影響

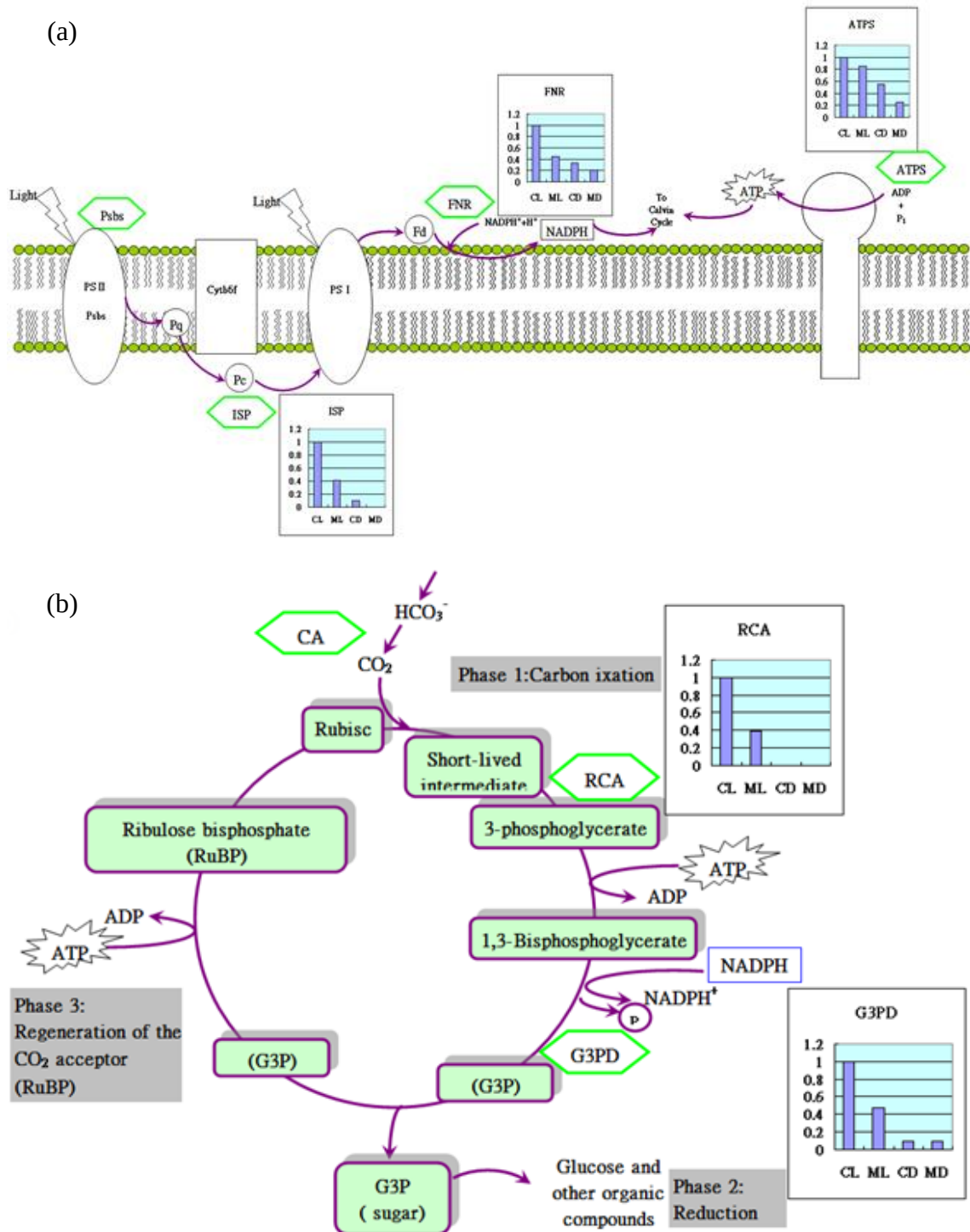
本研究中我們也用不同濃度的月桂烯處理另外兩種單子葉植物，也是重要的糧食作物—玉米與大麥，發現月桂烯亦會抑制此兩種植物之去白化過程 (圖十四)。



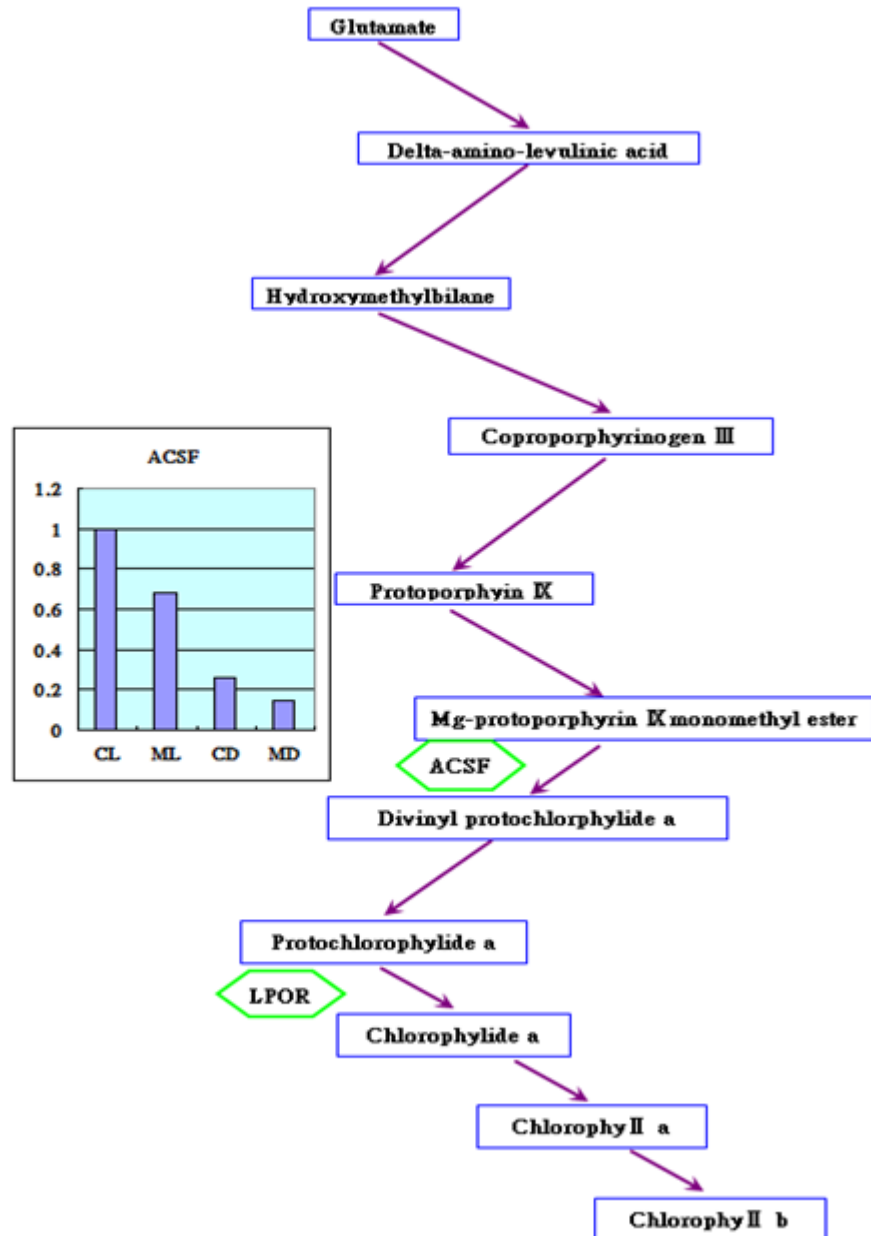
圖十四、月桂烯處理對玉米及大麥的影響

陸、 討論

一、找出九個參與光合作用之光反應、碳反應、葉綠素合成之基因所參與之代謝途徑。



(c)



圖十五、受月桂烯影響之光合作用與葉綠素合成相關基因代謝途徑

(a)光反應參與基因 *Psbs*, *ISP*, *FNR*, *ATPS*。(b)碳反應參與基因 *CA*、*RCA*、*G3PD*。(c)生成葉綠素參與基因 *ACSF*、*LPOR*。CL：無月桂烯下黑暗培養三日後光照 2.5 hr 處理；ML：黑暗中以月桂烯處理三日後照光 2.5 hr；CD：無月桂烯下黑暗培養三日後持續 2.5 hr 黑暗；MD：黑暗中以月桂烯處理三日後持續 2.5 hr 黑暗。

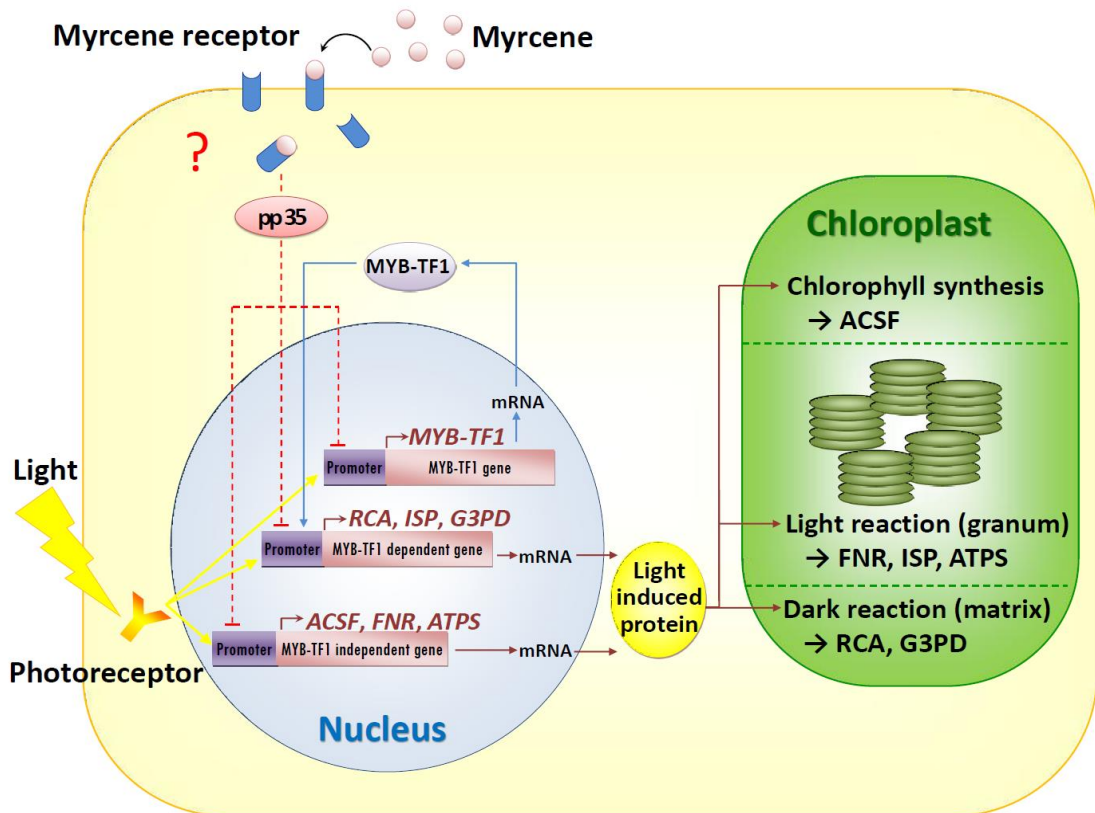
二、以 RT-PCR 分析九個參與光反應、碳反應與葉綠素生合成路徑之基因，在光照、黑暗、月桂烯處理之基因產物的累積量。實驗結果可知，月桂烯抑制去白化現象有三種不同途徑：

(一) 暗處基因幾乎不表現，照光後基因才表現，但表現量受月桂烯抑制，如 *RCA*、*ISP*、*G3PD*；

(二) 暗處基因會表現，且不太受月桂烯的影響，但月桂烯使照光後誘發基因表現的速率變慢所致，如 *FNR*；

(三) 在暗處基因表現就被月桂烯大量抑制，如 *ACSF*，*ATPS*。由基因表現量推測轉錄因子 MYB-TF1 與月桂烯抑制去白化現象有關，且推測 *RCA* 為其下游基因。

三、實驗結果發現我們所選擇的轉錄因子，只有 *MYB-TF1* 與月桂烯抑制水稻芽鞘去白化有關，讓我們更了解整個訊息傳遞的途徑。我們推測影響：一類是受 TF1 調控的基因(TF1-dependent genes)，如 *RCA*、*ISP*、*G3PD*；另一類是不受 TF1 調控的基因(TF1-independent genes)，如 *FNR*、*ASCF*、*ATPS*。(圖十六)



圖十六、月桂烯影響之轉錄因子與相關基因代謝路徑

四、本研究選擇的蛋白質激酶，與目前我們研究的去白化有關基因表現形式不同，所以尚未找到相關的蛋白質激酶，未來會再找其他相關蛋白質激酶繼續繼續研究。

五、本研究首度發現一個 35 kD 的 phosphoprotein (pp35) 在照光後會發生去磷酸化，而月桂烯處理會抑制此蛋白質照光後的去磷酸化，這暗示 pp35 可能參與月桂烯抑制水稻去白化現象。也發現有一未知蛋白質 pp18 經過月桂烯處理後會發生磷酸化，且無論光照與否並不影響此蛋白質累積量。

六、植物釋出的 VOCs 有許多功能，是與外界生物溝通的方式之一，例如吸引傳粉的昆蟲等。我們也從實驗結果知月桂烯抑制水稻的生長發育及去白化現象，可見 VOCs 含天然毒素，可抑制其他的植物生長。植物自己合成的 VOCs 雖然含天然毒物，但這些天然毒物是可被生物體分解的，不致造成汙染及體內毒素的累積，然而化學農藥卻是生物體難以代謝的。我們學習基礎生物課程

時，了解當環境中有些化學物質無法被生物代謝，生物食用或藉由體表吸收這些化學物質時，便累積於生物體內，經由食物鏈中各階層消費者的食性關係而累積，越高級消費著的體內其累積濃度越高，化學農藥可能透過此種生物累積作用(bioaccumulation)汙染環境，影響整個地球生態，並使人體累積毒素而造成病變。所以我們可以試著利用這些 VOCs 來當天然農藥，代替化學農藥。

柒、 結論與應用

在本研究中，我們利用植物天然散發出的揮發性小分子有機物質(VOC)——月桂烯為實驗材料，不但研究月桂烯對水稻生長與發育的影響，更進一步從分子的角度探討月桂烯抑制水稻芽鞘照光後之去白化的現象，並試著畫出整個可能的分子機制。

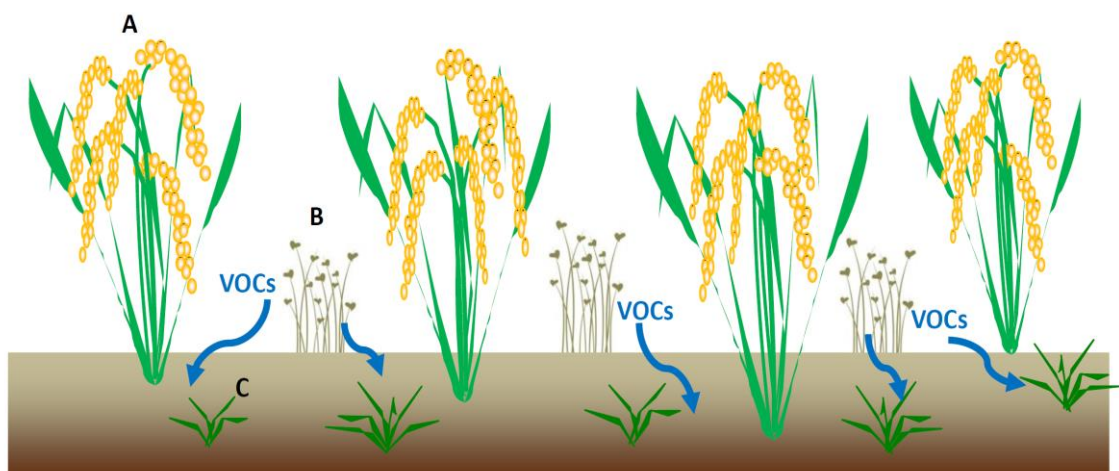
由實驗結果得知非常低濃度的月桂烯(0.92 ppm)就可抑制水稻幼苗之根長兩成，低濃度的月桂烯(3.68 ppm)也可抑制芽鞘中的葉綠素含量達三成左右。

水稻去白化的現象有不同途徑，如研究月桂烯抑制水稻去白化的現象中發現，*RCA*、*G3PD*等參與碳反應的基因累積顯著被抑制，其累積量為對照組的不到一半，且為轉錄因子TF1的下游基因；第二種是在黑暗下基因便開始表現，且不太受月桂烯的影響，但照光以後月桂烯會使光誘發基因的表現速率大量變慢，如*FNR*，因光照後月桂烯使基因的累積速率明顯降低。第三種是黑暗中月桂烯可抑制基因的累積，例如*ASCF*、*ATPS*等基因。

Takemiya(2013) 的研究指出，protein phosphatase 1 (pp1)會被藍光誘發。我們推測pp1經藍光照射後會將pp35去磷酸化，然而pp1會被月桂烯所抑制，因此pp35之去磷酸化受到影響，而使之失去活性，進而抑制了水稻的去白化現象。

自然界許多植物會釋放VOCs，可殺死空氣中的細菌、病原菌、真菌及害蟲等，或抑制周圍植物生長。不同植物因各具不同的VOCs成分，可殺死不同的病菌，並可導致植物相剋作用，使附近植物之生長與發育受抑制，由此現象可知VOCs可作為天然農藥。我們知道化學農藥可能無法被生物分解，且會有生物累積的現象。利用植物所散發出的VOCs當作天然農藥，代替化學農藥使用，能減少人類因攝取過量化學農藥而造成的身體病變，更能幫助整個生態環境的永續發展與平衡。可能的做法如下，先種植主要農作物，待主要農作物發育成熟後，再種植會釋出VOCs

的次要農作物，此次要農作物所釋出的VOCs對於已發育成熟之主要農作物的影響小，但會抑制雜草的生長(圖十七)。由於VOCs之種類繁多，且對於不同植物可能有不同的抑制效果，本研究鎖定月桂烯為研究材料，分析月桂烯對水稻的影響。由我們實驗結果可知水稻幼苗經月桂烯處理後，葉綠素的累積量會降低、生長速率變慢，我們未來也會探討月桂烯對於其他植物的影響，以及找出適合與水稻共同種植、可釋放月桂烯的植物，實際測試以月桂烯為天然農藥之效用，進而應用於農業上以抑制雜草生長。未來也將找尋更多適合應用於天然農藥的VOCs，期望以VOCs為天然農藥的概念可延伸至其他農作物。



圖十七、以 VOCs 作為天然農藥示意圖

A：主要農作物；B：次要農作物；C：雜草。

捌、 參考文獻

鄭湧涇、林金盾 (民98年)。高中選修生物。台北市：康熹文化。

Aarti, D., Tanaka, R., Ito, H., Tanaka, A. (2006). Effects of oxidative stress on chlorophyll biosynthesis in cucumber (*Cucumis sativus*) cotyledons. *Physiologia Plantarum*, 128(1), 186-197.

Aarti, D., Tanaka, R., Ito, H., Tanaka, A. (2007). High light inhibits chlorophyll biosynthesis at the level of 5-aminolevulinate synthesis during de-etiolation in cucumber (*Cucumis sativus*) cotyledons. *Photochem Photobiol.*, 83(1), 171-176.

Clark, D. P., Pazdernik, N. J. (2012). *Molecular Biology: Understanding the Genetic Revolution*. USA: Elsevier.

Dalal, V. K., Tripathy, B. C. (2012). Modulation of chlorophyll biosynthesis by water stress in rice seedlings during chloroplast biogenesis. *Plant Cell Environ.*, 35(9), 185-703.

Golisz, A., etc. (2011). Microarray analysis of Arabidopsis plants in response to allelochemical L-DOPA. *Planta*, 233, 231-240.

Hamamoto K., etc. (2012). Proteomic characterization of the greening process in rice seedlings using the MS spectral intensity-based label free method. *J. Proteome Res.*, 11(1), 331-347.

Horiuchi, J., etc. (2007). The floral volatile, methyl benzoate, from snapdragon triggers phytotoxic effects in Arabidopsis thaliana. *Planta*, 226, 1-10.

- Mohanty, S., Grimm, B., Tripathy, B. C. (2006). Light and dark modulation of chlorophyll biosynthetic genes in response to temperature. *Planta.*, 224(3), 692-699.
- Taiz, L., Zeiger, E. *Plant Physiology*. (5th ed., pp. 164-269). Sunderland, MA : Sinauer Associates.
- Takemiya A, Yamauchi S, Yano T, Ariyoshi C, Shimazaki K. (2013). Identification of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 which mediates blue light signaling for stomatal opening. *Plant Cell Physiol.*, 54(1), 24-35.
- The National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

玖、 附錄

附錄一：相關教材連結

一、高中基礎生物：

主題貳、植物的營養構造與功能

1. 植物的營養構造與功能
2. 植物對環境刺激與反應

主題肆、遺傳

1. 遺傳物質，DNA 的構造與功能
2. 基因的表現

主題陸、生物與環境

1. 自然保育與永續經營

二、高中應用生物：

主題壹、生物科學與農業

1. 生物病蟲害及疾病的防治

主題肆、生物科學與環境

1. 永續環境

三、高中選修生物：

主題肆、植物生殖與生長

1. 影響植物生長因素
2. 植物對環境刺激的反應：植物在逆境下的反應、植物的反應

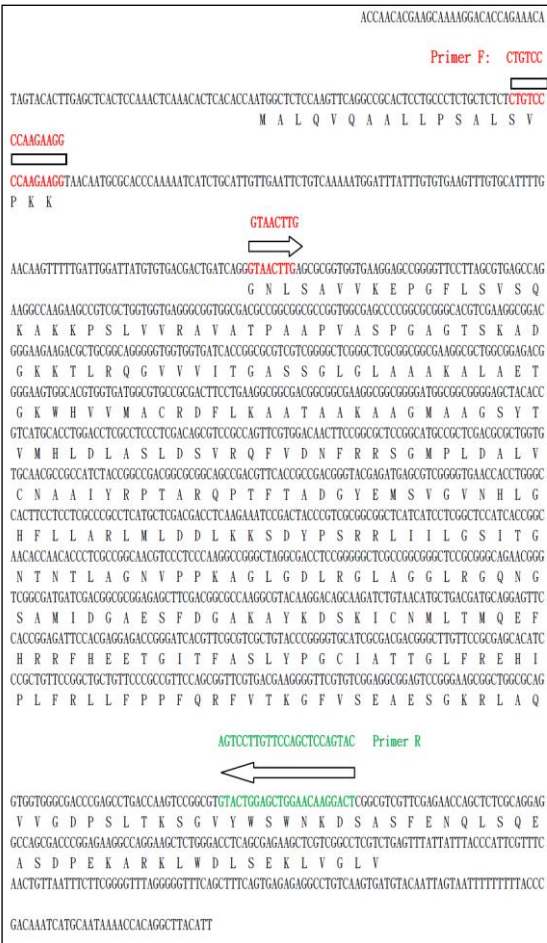
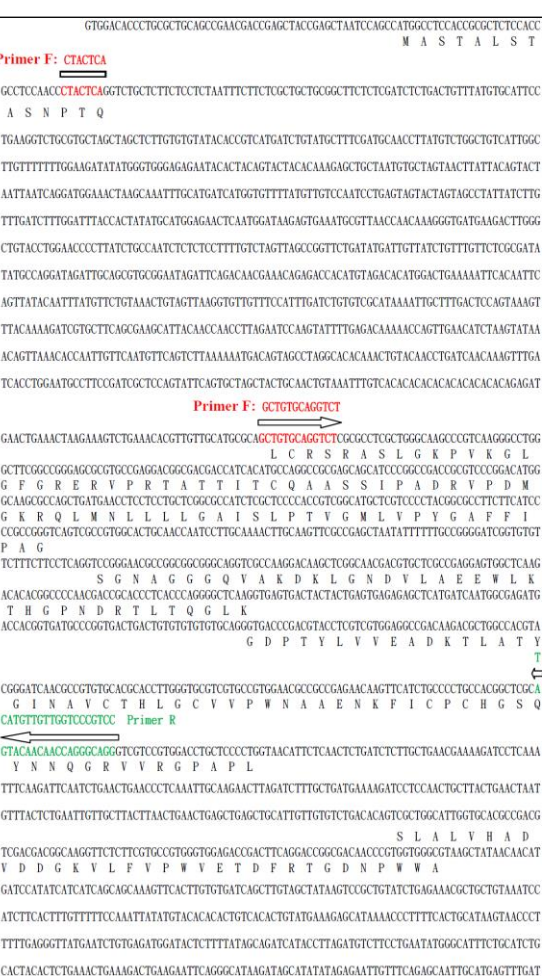
主題拾壹、遺傳

1. 核酸與遺傳：核酸的發現、DNA和RNA、DNA的複製
2. 基因的表現：轉錄與轉譯、基因表現的調控
3. 生物技術：重組DNA、基因轉殖、聚合酶連鎖反應(PCR)

主題拾叁：保育生物學—生物多樣性保育的策略

附錄二：基因序列與 primers 的設計

第一個基因: Os07g0513000(ATPS) gDNA: 1478 bp, cDNA: 1478 bp, amino acids: 358 aa PREDICTED: ATP synthase subunit gamma, chloroplastic-like Primer F: ATCGAGGAGCTCAAGCAGCT Primer R: GCTTGTACATTTGGCATCGC	第二個基因: Os03g0129300 (G3PD) gDNA: 3186 bp, cDNA: 1666 bp, amino acids: 444 aa PREDICTED: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase Primer F: TCCAAGCAGAGGGGTGGACTT Primer R: CCGGTACCCTCGATGACAAAT

第七個基因: Os01g0869800 (<i>Psbs</i>): gDNA: 2559 bp DNA, cDNA: 1064 bp, amino acids: 268 aa PREDICTED: photosystem II 22 kDa protein, chloroplastic-like Primer F: CAAGAAAGGCTGAGCCGAA Primer R: CGAAACCTCGGTAGATCGATC	第八個基因: Os07g0556200 (<i>ISP</i>) gDNA: 2484 bp, cDNA: 1081 bp, amino acids: 225 aa PREDICTED: Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit Primer F: CTACTCA GCTGTGCAGGTCT Primer R: CCTGCCCTGGTTGTTGTACT
	

附錄三：葉綠素a、b的計算方式

葉綠素 a (mg/gFW) = $[12.7 \times (A663) - 2.69 \times (A645)] \times V / (1000 \times W)$

葉綠素 b (mg/gFW) = $[22.9 \times (A645) - 4.68 \times (A663)] \times V / (1000 \times W)$

葉綠素總量(Tchl)(mg/gFW) = $[20.2 \times (A645) + 8.02 \times (A663)] \times V / (1000 \times W)$

A663：葉綠素抽取液在波長 663 nm 的吸光值

V：葉綠素 80%丙酮抽出液的總體積 (mL)

W：葉片組織的鮮重量 (g)

附錄四：觀察myrcene抑制植物去白化的現象



附錄五：TEM使用藥品

1. Preparation of phosphate buffer

Prepare 0.2 M phosphate buffer by mixing x ml of 0.2 M Na_2HPO_4 (Stock B) with

y ml of 0.2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Stock A), then store at 4 C.

Stock A: 0.2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	(31.2 g/l)
Stock B: 0.2 M Na_2HPO_4 (anhydrous)	(28.4 g/l)

pH	Na ₂ HPO ₄ (Stock B; x ml)	NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O (Stock A; y ml)
7.2	36	14
7.3	39	11
7.4	40.5	9.5

2. Paraformaldehyde-glutaraldehyde fixative

(1) Dissolve 2 g of paraformaldehyde (powder) in 20ml distilled water by heating to 65°C in a fume cupboard and by adding one or two drops of 1.0 N sodium hydroxide until the solution clears.

(2) When the solution is cool, prepare the fixative as follows:

10% paraformaldehyde in water	20 ml
0.2M phosphate buffer at required pH	50 ml
25% stock glutaraldehyde solution	10 ml
Distilled water	20 ml
Total	100 ml

3. Glutaraldehyde fixative is an alternative

If paraformaldehyde is not available, prepare the 2.5% glutaraldehyde fixative as follows:

0.2M phosphate buffer at required pH	50 ml
25% stock glutaraldehyde solution	10 ml
Distilled water	40 ml
Total	100 ml

附錄六：SDS-PAGE藥品及試劑

1. 膠體配置

	分離膠體(10%)	焦集膠體(4%)
A 液(30%)	6.70	0.66
B 液	5.00	—
C 液	—	1.24
10% SDS	0.20	0.05
H ₂ O	8.00	2.95
APS	0.10	0.10
Total	20.00	5.00

2. 分離膠體各成分在小燒杯中混合均勻後，倒入鑄膠組合到 8 成高，，再輕輕小心上一層水層，靜置 30 分鐘。

3. 倒去水層，加入焦集膠體溶液到滿，並插入樣品槽齒模，靜置 30 分鐘。

(1) A 液：丙烯醯胺液 (total 30%, cross-linking 2.6%) 29.2 g acrylamide + 0.8 g Bis，加水至 100 ml。

(2) B 液：分離膠體緩衝液 (running 或 separation buffer) 90.8 g Tris base + 108 ml TEMED，加水 300 ml，以 1 M HCl 調 pH 8.8，再加水至 500 ml。

(3) C 液：焦集電泳緩衝液 (stacking buffer) 6 g Tris base + 0.4 ml TEMED，加水 40 ml，亦以 1 M HCl 調 pH 6.8，再加水至 100 ml。

(4) D 液：電泳緩衝液 (chamber buffer) 5 x 30.3 g Tris base + 142.6 g glycine (甘氨酸)，加水 800 ml，pH 調至 8.3，再加水至 1 L，使用時稀釋 5 倍。

(5) E 液：樣品溶液 2 X: 3 g Tris base + 14.8 mg EDTA + 4 g SDS + 10 ml 2-mercaptoethanol，加水 80 ml，pH 調至 6.8，再加水至 100 ml。

(6) F 液: 通用電泳緩衝液 5 x: 54.5 g Tris base + 24.8 g boric acid + 4.7 g EDTA, 加水 800 ml, pH 調至 8.4, 再加水至 1 L。

(7) 10% SDS

(8) 5% APS

附錄七：蛋白質標準分子量

一般常用的有 Myosin (250 KDa), phosphorylase (94 KDa), albumin (67 KDa), glutamic dehydrogenase (64 KDa), alcohol dehydrogenase (50 KDa), ovalbumin (43 KDa), carbonic anhydroase (36 KDa), myoglobin (30 KDa), trypsin inhibitor (20 KDa), lysozyme (16 KDa), lactalbumin (14.4 KDa), aprotinin (6 KDa), insulin B chain (4 KDa)。

評語

探討 myrcene 抑制水稻去白化作用的分子機制，研究有具體的初期結果，特別能鑑定出參與作用的基因種數，然而詳細的作用機制仍待進一步的分析。