

出國報告（出國類別：研究）

# 盤固草抗病性機制與防禦基因表現之 研究

服務機關：畜產試驗所恆春分所

姓名職稱：張敏郎助理研究員

派赴國家：美國

出國期間：95年11月6日至96年2月7日

報告日期：96年5月22日

## 摘要

利用植物本身所具有的抗病系統來增強及提高其抵抗病害的抗性，是最直接可行的育種方式，可減少傳統栽培過程，過度使用農藥造成農藥殘留及降低污染環境的問題，達到農業永續經營。

經盤固草品種篩選，品種間呈現明顯抗耐性差異。明瞭抗病性機制與植物防禦基因的表現，是抗病育種成功的關鍵。此行赴美目的為研習作物防禦基因的表現，並利用單子葉模式植物(水稻)的基因組、基因結構與基因功能等生物資訊資料分析，進行預測與選殖盤固草可能的防禦基因種類與表現情形，建立初步資料。從水稻基因組資訊搜尋多個防禦基因與其基因序列，比對各個基因序列的保守區域與功能區域，設計特殊探針與引子，進行基因選殖與偵測。抽取植物 mRNA 進行 PCR 擴增，收集 PCR 產物進行分析與定序。將所得片段序列進行資料庫比對(BLAST)與分類，明瞭片段序列之可能基因種類等相關資訊，建立盤固草基因轉錄資料，提供日後參考與應用。

## 目次

一、目的.....	1
二、過程.....	2
三、心得.....	4
四、建議事項.....	14

## 一、目的

盤固草(*Digitaria decumbens*)，為本省主要栽培的禾科牧草，供多方面利用，產量與品質俱佳，是熱帶與亞熱帶地區的優良牧草，更是台灣地區的主要芻料作物。台灣盤固草經多年栽培，銹病危害嚴重，因此，更新栽培品種與強化育種研究刻不容緩。唯受限於牧草特異之遺傳組成與有限的育種材料來源，育種研究進展有限。

近年來，由於農業生物技術發展日新月異，應用農業生物技術進行盤固草品種改良及提昇牧草品質，是為未來的研究與發展方向。抗病育種過程中，首先必須了解其抗病與罹病之生理生化特性，尤其抗病機制的研究特別重要。植物抗病的分子機制，因作物種類而異，但其過程複雜且路徑多樣，使相關研究困難。

本次赴美研習，除對牧草作物遭受病原菌感染與對抗過程中，罹病與抗病等特性作一釐清外，並針對作物可能的防禦路徑，加以分析與探討，尤其著重防禦基因的表現。另配合分析模式植物水稻與阿拉伯芥的基因組體學，研習最新的學科-生物資訊技術，明瞭基因的結構與可能功能，期將研習所得技術應用於國內盤固草相關研究。

## 二、過程

### 1. 研習行程

95 年 11 月 6 日 啓程由台灣台北出發

95 年 11 月 7- 8 日 轉機至 Iowa state

95 年 11 月 9-11 日 參觀 University of Iowa

拜會 University of Iowa, department of biological, Roy J. Carver Center for comparative genomics, 植物分子生物、生理與生化實驗室

95 年 11 月 12 日至 96 年 2 月 2 日 相關研究及試驗進行

96 年 2 月 2-4 日 辭謝行程

96 年 2 月 5-7 日 回程

### 2. 研習過程

本次研習目的地為美國愛荷華大學生物系。美國愛荷華州(Iowa state)，位處美國中部，美加邊境五大湖區最大湖-密西根湖之西南方，臨近美國中部大城芝加哥市，交通極為便利。愛荷華州是典型的農業生產地區，主要農作物為玉米與大豆。愛荷華大學(University of Iowa, UI)為一建校歷史悠久之州立大學，位處舊首府 Iowa city，環境清幽寧靜，教學與研究環境佳，學風鼎盛，是一所教學與研究並重的大學。愛荷華大學生物科學系(department of biological sciences)屬 Liberal Arts and Sciences 學院，在生物學的研究領域，有著舉足輕重的地位。系所的教師與研究人員多達數百位，各有專精同時研究設備齊全與研究經費充足，更是這個系所能充分進行研究的後盾。該系在演化、遺傳、細胞與發育生物學、neurobiology 與植物科學等領域研究表現出色。

Roy J. Carver Center for comparative genomics，這個單位類似我國一些研究單位的基因體中心，除教學與研究工作外，對外亦提供收費服務。該中心分 Sequencing center, Microarray center 及 Computing center 三個部門，進行不同領域的研究工作。其中，Sequencing center 最主要的工作是 DNA 序列的定序。功能性基因體學(Functional genomics)研究最基本的研究工具就是 micro-array 或 chip, chip 本身含有數千個不同的 DNA 序列，經由 micro-array 分析，可知基因的轉錄型式，轉譯、後轉譯修飾、蛋白質與 DNA 及蛋白質間的相互作用。Microarray center 已建立一套完全的比較基因體研究模式，可快速且正確的分析基因，可進行功能強大、迅速且正確的生物資訊分析與解讀。

停留美國期間，除就盤固草牧草品種間的罹抗性特性作進一步研究外，主要跟隨 Professor Shih 研習植物分子生物學與生物資訊的應用。Professor Shih,為該系教授兼基因體中心主任，來自台灣，畢業於東海大學生物系與生物研究所，後赴美至芝加哥大學生物系進修博士。取得博士學位後，便留在美國進行博士後研究與教學，之後應聘至愛荷華大學生物系擔任教職至今。他的研究專長在植物分子生物學、遺傳演化與功能性基因體學等方面研究。

基因體研究中心研究人員多，設備先進，經費充裕。植物生物資訊主要研究

模式植物基因體，藉助電腦連接於包括 NCBI 及 TIGR 等資料庫(圖 1)，進行植物基因搜尋與比對、基因功能註解與基因細微結構(圖 2)。在明瞭基因結構與其功能性後，經由基因種類的篩選，選取特殊基因序列，包括未轉譯序列及完整的基因組序列，其中應用最多的是可轉譯蛋白質的序列(Coding sequences, CDS)與基因序列兩端未轉譯區域序列(Untranslated Region, UTR)。

相關基因經評估後選取可用基因序列，利用比對軟體，進行多基因序列比對(multiple sequence alignment)，搜尋相關可用資訊。利用相關基因的功能註解與基因結構等資料，進行探針與引子設計，並抽取植物 DNA 或 RNA，測定活性與定量，進行 PCR 擴增與 PCR 產物分析與定序，利用電泳分離方式分析植物體在不同器官與不同發育時期基因表現情形。基因的種類因作物而異，同一種植物的基因數目與種類多，基因分析與篩選工作複雜與繁重，不是短時間即可達成，本研習先建立技術與相關資料，俾利日後研究。



NCBI 資料庫



TIGR 資料庫

圖 1 本研究連結使用的主要植物生物資訊資料庫

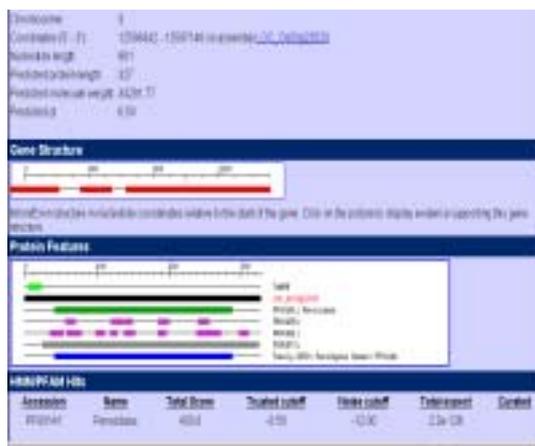


圖 2 基因的功能註解與詳細鹽基序列是明瞭基因功能的基本資料

### 三、心得

#### (一)植物對抗病原菌侵染之防禦機制與相關研究進展

雖然只是短期的研究，但是生物系師生很熱情，邀約參與他們固定每週的研討會議，尤其在植物病害的相關研究上，如訊號傳遞與基因調控的概念，使我對植物抗病分子機制有更清楚的概念。

植物存有許多複雜的防禦體系。許多植物受到一種病斑易被局部受限的病原菌感染後，迅速在不同組織中誘導產生一持續性的抗性反應，以對抗病原菌擴散，此種現象即為局部系統抗性反應（system acquired resistance, SAR），如植物誘發的過敏反應（Hypersensitive response）及細胞死亡（Hypersensitive cell death）現象。此種基本的防禦反應廣泛存在植物體，以對抗病原菌之侵染，而其防禦基因表現模式，依賴寄主植物的抗性基因與病原菌致病基因間的相互確認作用，初期透過產生局部防禦反應以對抗病原菌。HR 常發生在病原菌感染非寄主植物或對病原菌具有抗性的植物，即病原菌與植物間呈不親和性(incompatibility)關係時，以對抗病原菌之侵染與危害。通常這些反應會造成細胞壁組成與物理特性的改變，次級代謝物的產生(酚酸類化合物)，甚至部分或局部細胞枯萎壞死，阻止或減緩病原菌擴展，因而使植物更具有抵抗能力。目前有關 HR 產生機制與植物的計畫性細胞死亡（programmed cell-death）等現象間的關聯性，了解仍然有限。HR 反應，常伴隨過氧化酵素活性增強、木質素含量增加及水楊酸累積等現象，氧化態暴增現象亦被證明可啟動植物細胞死亡的發生。

植物體內存在有多種不同路徑的信號分子，如水楊酸、茉莉酸(jasmonic acid)和乙烯。這些信號分子在植物初級抗性反應過程中特別重要。這些訊號因子會隨著相關防禦基因的活化，活性與表現量會逐漸增高。經由外源施加這些化合物可導致植物抗性的提昇，與利用植物突變株的遺傳分析可確認訊號分子在抗病或其他逆境所扮演的角色。水楊酸在植物中的作用主要表現在對病原菌侵染的抗性反應。透過傳導路徑，激活植物體內防禦基因表達，使植物表現對生物逆境的抗性反應。植物防禦反應的調控非常複雜，各種防禦信號路徑間可相互影響，交叉反應，並形成多種抗性機制，欲釐清各種抗病機制實有困難。茉莉酸主要是傷害反應的信號分子，其衍生物茉莉酸甲酯是蛋白酶抑制子的一種誘導物質。乙烯在植物面對生物性逆境下的作用不明顯，在一些特殊情況下參與抗病，有時與植物病害症狀發展有關。另外，最新的一種訊號分子為一氧化氮(nitric oxide, NO)，也被認為是植物防禦反應重要訊號分子。NO 是一種廣泛存在動物體內的可擴散分子，參與許多動物的生理反應，最近才被確認為植物逆境生理上重要的訊號分子。

研究顯示當植物被不同病原菌感染侵害時，在植物與病原菌間相互作用下，HR 的活化與植物防禦基因的表現，主要是受到許多植物基因經轉錄而編碼成蛋白質所加強，這些防禦基因編碼的蛋白質扮演著相當重要的生物活性。這些蛋白質都是訊號傳遞路徑的關鍵物質，缺乏時就無法進行訊號傳遞。植物被病原菌感染時，在最初的很短時間內，防禦基因的轉錄量即呈明顯變化。組織學的研究顯

示，當真菌孢子在植物表面發芽並形成發芽管與附著器等特殊侵入構造，經由氣孔侵入植物細胞時，植物組織即已顯現出抗性等過敏現象。因此，研究寄主植物與真菌病原菌之交互作用過程中基因的表現，有賴細胞組織結構上之研究，以提供真菌於感染寄主植物後感染構造之發育過程正確信息，並可作為遺傳控制利用與參考。

當植物被病原菌感染侵害時，會誘導一類過氧化酶基因的活化，增強植物的抗病性，歸類為病原相關蛋白-9 家族(Pathogenesis-related protein, PR-9)。水稻經接種水稻紋枯病原真菌，過氧化酶基因活性有增加的現象；接種細菌性葉斑病原菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)於具抗病水稻品種，有兩個過氧化酶基因 *POX8.1* 與 *POX 22.3* 被誘導表現。第三類植物過氧化酶是一類利用過氧化氫催化許多不同受質，進行氧化還原反應的一群同功酵素。這些同功酵素群，在植物面對各種病原菌(如細菌、真菌、病毒與根瘤線蟲)的侵入防禦等抗病特性，扮演著重要的角色。如誘導木質化與單寧化、多種細胞壁蛋白質的聯合作用、木質部細胞壁增厚、活性氧族生成、過氧化氫的清除、植物螯化物質(Phytoalexins)合成、過氧化酶本身的蛋白抗菌活性與植物荷爾蒙代謝等均有相關。但是，截至目前為止，有關這群酵素在分子層次的抗病機制了解仍然有限，有待更進一步的研究。

## (二)盤固草銹病菌與寄主盤固草間交互作用關係

銹病(Rust diseases)主要病原菌為銹病真菌 (Rust fungi) 危害，銹病真菌分類上屬銹病目 (Uredinales)，除包括最常見的 *Puccinia* 屬外，另有其他屬共有 10 屬。其生態特性為一絕對寄生真菌，寄生植物種類及範圍廣泛，主要危害禾本科及豆科作物，影響生長與生育，明顯降低產量與品質，為重要真菌性病害且化學藥劑防治成效有限。

禾本科植物銹病(*Puccinia* spp.)真菌孢子經感染寄主植物後，在植物葉表發育與進一步感染構造形成，經由光學顯微鏡及電子顯微鏡觀察，已有詳細敘述。銹病菌真菌孢子經由風與雨水散佈於葉片表面，在適宜環境(溼度與溫度)迅速發芽，形成發芽管與附著器固著於葉片後，透過植物自然開口-氣孔，直接進入細胞間隙，此時病原菌與細胞間仍彼此區分。寄主植物在銹病菌孢子發芽時，即透過訊號傳遞啟動防禦機制。銹病菌為絕對寄生菌，因此並不會造成寄主細胞的死亡，但明顯影響寄主生長與代謝活動。當孢子發芽後，形成發芽管與附著器等特殊構造，經氣孔進入植物細胞後，開始進行異營寄生生長，並更進一步形成菌絲等構造，吸取養分生長，進而干擾寄主細胞的代謝與發育。病原菌銹病真菌為增殖，必須發展具備一組基本的真菌感染基因，以確認感染過程能成功無誤。這些感染機制複雜，包括有能力偵測氣孔位置以便銹病菌孢子侵入，且必須能抑制寄主抗性基因的抵抗反應，寄主植物相關防禦基因通常會因病原菌入侵感染而被誘導，進行初步的防禦反應。釐清寄主細胞因受病原菌感染所誘導基因的種類與表達，可提供病原菌與寄主間相互作用的分子層次研究，但寄主這些基因的表達與扮演角色，在分子層次研究甚為困難，主要是因為缺乏銹病真菌基因組序列與其感染轉型研究等相關較為詳細研究。另外，真菌亦能分泌數種蛋白進入寄主細

胞，執行病原菌與寄主細胞間相互確認與交感反應。因此，日後有必要針對這些基因反應加以釐清。

近年來有關基因序列定序技術的成熟與精進，生物資訊學的發展與應用潛力配合，應用現有模式植物的基因表現群來推測其他作物基因功能自有其價值。水稻為單子葉植物模式植物代表，也是草類家族的一員，因其有較小的基因體、二倍體特性、易轉殖性與已建立完全的遺傳與分子資源等因素，得以成為一相關研究的模式植物，提供生物資訊資料參考與應用。

### (三)抗性機制分子層次反應

為進一步瞭解盤固草被銹病病原菌感染後分子層次反應，包括防禦基因與抗病基因的表現情形，著手進行基因選殖與建構 cDNA library。首先，連結 NCBI 等多個資料庫，蒐詢盤固草的相關研究資料，但均無相關資料可供參考利用。因此，必須藉助其他禾本科或他種植物的已知基因序列來進行構建 cDNA library。其次，選取盤固草植株，區分不同生育期與器官，收集莖、葉與根的新鮮樣本，存放於-80°C 中保存，以備日後進行 cDNA library 建構。因此，收集其他禾本科或他種植物的已知防禦基因與基因序列，如蛋白質激酶、蛋白質轉運載體、磷酸酶、MAPK(Mitogen Activated Protein Kinase)、轉錄因子與病原相關蛋白(PR)等為主要研究工作。利用幾個主要作物資料庫，如水稻 Oryzabase、禾本科植物 Gramene、NCBI dbEST and KOME 等資料庫(圖 3)，來蒐集相關基因資訊。Oryzabase 是一個整合型的水稻科學資料庫，內容主要涵蓋水稻的遺傳種源、基因目錄、基因圖譜、突變體及基本知識；Gramene 資料庫則收集所有禾本科植物的農藝性狀、基因、蛋白質、突變體與圖譜等相關資料。NCBI 的 db EST 資料庫，專門收集 EST 序列，內含非常豐富的水稻 EST 資料庫供搜尋。KOME 資料庫收集有梗稻(japonica rice)之 FL-cDNA 選殖體、序列、圖譜與核苷酸序列，並列出以 BLASTN 比對 GenBank 資料庫、BLASTX 比對 SWISS-PORT 資料庫的有關基因功能註解結果。



圖 3 本研究使用搜尋與比對之水稻與禾本科植物資料庫

本研究在水稻的 Oryzabase 資料庫中，點選「Genes」基因功能選單，利用性狀基因查詢(Trait Genes Search)，並輸入相關抗性基因關鍵字或基因名稱，可搜尋得到多筆資料。如查詢水稻 MAPKinase 有 23 筆資料與 WRKY transcript factor 有 234 筆資料(圖 4)。如欲知每一筆資料詳細內容，須逐一點選了解資料內容後，依研究需要下載利用。從 Gramene 資料庫中，點選「QTL」基因功能選單，利用簡單查詢(Simple Search)，於「Search by Trait Category」中點選「Biotic stress」，得到表格目錄後再依自己需要選取(圖 5)。點選查詢有關 fungal disease resistance 之基因訊息，可得到 5 筆資料(圖 6)。NCBI 的 dbEST 資料庫，直接輸入關鍵字即可搜尋到許多資料，但因搜尋所獲得的資料較多，需要逐筆確認較為耗時。從 KOME 資料庫亦直接輸入關鍵字，即可查詢到相關基因的全長 Cdna (FL-cDNA)資訊。利用此種連結資料庫的方式搜尋基因訊息極為容易，但相較於相關基因序列的利用，就顯得較為困難。

在 NCBI 的 dbEST 資料庫中，如查詢 grass EST 關鍵字，可搜得 37111 筆核苷酸資料(圖 7)，點選其中一筆資料，可得包括基因序列單一 EST 詳細資料。利用 dbEST 資料庫搜尋所得的資料數量最多，而且這些資料都是片段序列，通常歸類為表現序列標幟(expressed sequence tag, ESTs)。表現序列標幟(ESTs)是生物在不同生育時期或階段所取得的 mRNA，藉由反轉錄酶作用，而獲得的 cDNA 序列片段，直接研究 EST 可獲得許多基因表現的訊息。基因組的研究對於鑑定基因表現，廣泛應用表現序列標幟。雖然 EST 數量最多，而且也只是 cDNA 的一個片段序列，但因有快速、低廉且直接的優點，故成為連接結構基因組與功能基因組間的橋樑。進行 EST 分析可提供基因辨識、新基因發現與基因間表現差異等研究，是快速獲得序列資訊來源及提供功能性基因組研究的來源。本研究中所獲得的片段序列均屬此種序列，經定序與比對後，據此建立相關的 EST 資料，可供日後研究參考。

Accession No.	start to end / length	Cls. No.	Features	qualifier values
AF083209	1 to 403 / 403	11	E.C.D	MAPK-like protein
AF083206	1 to 1078 / 1078	8	G.C	MAPK5, MAPK8
AF194410	1 to 2032 / 2032	8	G.C	MAPK5, MAPK1, RANP11
AF194410	1 to 1862 / 1862	2	G.C	MAPK2, MAPK3, RANP10
AF201766	793 to 1276 / 1544	2	C	MAP kinase MAPK2
AF472602	1 to 1336 / 1336	3	G.C	MAPK5, OsMAPK5, MAPK5, MAP kinase MAPK5
AF472604	1 to 1004 / 1004	3	G.C	MAPK5, OsMAPK5, MAPK5, MAP kinase MAPK5
AC292011	1 to 1407 / 1407	3	G.C	mapk2, mapk2, MAPK2 protein
AC291326	1 to 1023 / 1023	8	G.C	mapk4, mapk4, MAPK4 protein
AJ144581	1 to 453 / 453		G.C	mapk1, mapk1
AJ144582	1 to 408 / 408		G.C	mapk3, mapk3
AF083202	2770 to 2885 / 10740	1	G.M.C.D	putative MAPKs
AF083201	7867 to 8411 / 16942	1	G.M.C.D	MAPK encoding protein-like
AF083203	10947 to 11000 / 15424	1	G.M.C	putative MAPKs

Accession No.	start to end / length	Cls. No.	Features	qualifier values
AC297709	4935 to 4981 / 10749	1	G.M.C.D	putative WRKY DNA binding protein
AC297727	41791 to 42780 / 13899	10	G.M.C.D	similar to DNA binding protein WRKY3 (E:AA133076 (148996)) (alpha coding)
AC297707	7245 to 7380 / 10870	3	G.M.C.D	similar to WRKY DNA binding protein (E:CA88004 (191676)) (beta-untranscribed EST K001200 from this gene)
AC297695	8063 to 9141 / 11220	6	G.C	WRKY transcription factor 5, WRKY transcription factor 5
AC297710	8610 to 7140 / 10479	3	G.M.C	similar to WRKY3 (E:AA133076 (148996)) (beta-untranscribed EST K001200 from this gene)
AC297712	10042 to 12464 / 14704	6	G.C	unknown protein, contains WRKY DNA-binding domain, unknown protein, contains WRKY DNA-binding domain
AC297713	8300 to 11100 / 11278	5	G.C	unknown protein, contains WRKY DNA-binding domain, unknown protein, contains WRKY DNA-binding domain
AC297694	3078 to 3080 / 10704	5	G.C	putative WRKY transcription factor, putative WRKY transcription factor

圖 4 利用 Oryzabase 資料庫查詢水稻遭受病原菌感染時誘導防禦基因資訊

Items 1 to 19 of 19

Trait Name	Trait Symbol	TO Accession	Number of QTL	
allelopathic effect	ALLELPATHEF	TO:0000624	7	<a href="#">View</a>
bacterial blight disease resistance	BBRS	TO:0000175	36	<a href="#">View</a>
barley fusarium head blight resistance	Hv_FUSHEADBTRS	TO:0000660	45	<a href="#">View</a>
blast disease resistance	BLRS	TO:0000074	183	<a href="#">View</a>
brown planthopper resistance	BPHRS	TO:0000424	93	<a href="#">View</a>
deoxynivalenol concentration	DONCONC	TO:0000669	2	<a href="#">View</a>
disease resistance	DSRS	TO:0000112	1	<a href="#">View</a>
fungal disease resistance	FGDSRS	TO:0000439	5	<a href="#">View</a>
green leafhopper resistance	GLFHR	TO:0000212	2	<a href="#">View</a>
NCLB area under disease progress curve	NLFBTPROGCV	TO:0000693	4	<a href="#">View</a>
NCLB incubation period	NLFBTINCUBPD	TO:0000692	2	<a href="#">View</a>
pearl millet downy mildew resistance	Pg_DNMDRS	TO:0000626	24	<a href="#">View</a>
rice yellow mottle virus resistance	RYMVRS	TO:0000086	24	<a href="#">View</a>
sheath blight disease resistance	SHBTRS	TO:0000255	37	<a href="#">View</a>
tetraploid wheat fusarium head blight resistance	Tt_FUSHEADBTRS	TO:0000673	1	<a href="#">View</a>
viral disease resistance	VDSRS	TO:0000148	1	<a href="#">View</a>
wheat fusarium head blight resistance	Ta_FUSHEADBTRS	TO:0000663	8	<a href="#">View</a>
white-backed planthopper resistance	WBPFRS	TO:0000205	20	<a href="#">View</a>
yellow dwarf disease resistance	YDRS	TO:0000292	53	<a href="#">View</a>

圖 5 利用 Gramene 資料庫查詢水稻數量基因座資訊

QTL Accession ID	Species Name	Trait Symbol	Trait Name	Published Symbol	Trait Synonyms	Trait Category	Linkage Group
AQBW001	<i>Hordeum vulgare</i>	FGDSRS	fungal disease resistance	QNb5-GaHa-7H	reaction to net blotch	Biotic stress	7H
AQBW002	<i>Hordeum vulgare</i>	FGDSRS	fungal disease resistance	QNb5-GaHa-7H.1	reaction to net blotch	Biotic stress	7H
AQBW003	<i>Hordeum vulgare</i>	FGDSRS	fungal disease resistance	QNb5-GaHa-7H.2	reaction to net blotch	Biotic stress	7H
AQHA001	<i>Triticum aestivum</i>	FGDSRS	fungal disease resistance	QHap.wsu-6B.1	reaction to net blotch	Biotic stress	6B
AQHC001	<i>Triticum aestivum</i>	FGDSRS	fungal disease resistance	QKB.kau-4BL	reaction to net blotch	Biotic stress	4B

圖 6 搜尋 Gramene 資料庫水稻數量基因座之有關 fungal disease resistance 基因資訊



圖 7 NCBI dbEST 資料庫查詢 grass EST，可得 37,111 筆相關資料與相關內容

一般而言，針對 EST 分析與功能註解的最好方法，是將 EST 序列直接利用 BLAST (Basic Local Alignment Search Tools)軟體，去比對(Align) NCBI (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>) 資料庫或 MIPS (MatDB, <http://mip.gsf.de/proj/plant/jsf/athal/searchjsp/searchSequence.jsp>)資料庫，然後再將所比對得到的相似性序列，進一步利用 MIPS 功能分類系統 (MIPS Functional Catalogue)來進行功能註解與分類。本研習亦採此種方式，將定序完成的片段序列，利用 BLAST 軟體比對與排序，搜尋可能基因的種類(圖 8)，可將搜尋結果逐一點選，了解資料內容再參考利用。

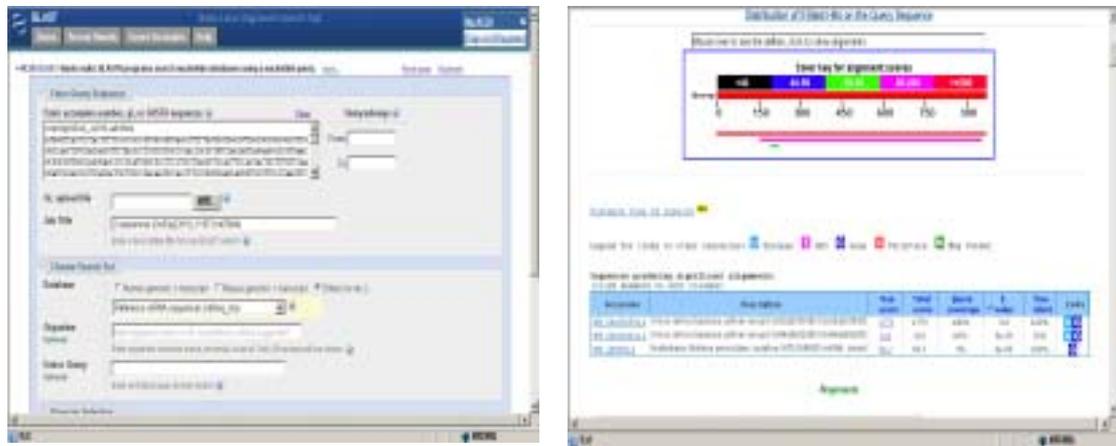


圖 8 片段序列(EST)經搜尋與比對後結果分析

分析盤固草被銹病菌病原菌感染後分子層次反應，包括防禦基因與抗病基因的表現情形，本研究亦著手進行實驗確認。先抽取接種感染的植體葉片 Total RNA，利用 ATA 法或 TRIzol 藥劑 (Invitrogen Crop., Carlsbad CA)分離 RNA。取樣品 50-100 mg 加入液態氮研磨均勻，添加 1ml TRIZOL 溶液後，於室溫下靜置 5 minutes；添加 200 ul 氯仿並行劇烈搖晃後，於室溫下再靜置 5 minutes；4°C 離心 15 minutes。取上層液 400 ul 至一新離心管並添加 100 ul isopropanol 與高鹽溶

液 (1.2 M Sodium Citrate, 0.8 M NaCl)，於室溫下靜置 10 minutes；於 4°C 離心 10 minutes，輕倒溶液存留 RNA，可見白色 RNA 沉澱。利用 75% EtOH 與 100% EtOH 沖洗沉澱後風乾。將 RNA 沉澱再溶於 DEPC 溶液中，待充分溶解後分析 RNA 品質與定量。將所得 RNA 樣品調整至適宜濃度後添加 1/10 體積的 10X DNase Buffer，於 37°C 靜置 20-30minutes，進行 DNase 處理，並用 agarose gel 測知 RNA 品質，進一步提供後續 RT-PCR 或 PCR 擴增反應用。

在配置適當濃度的 RNA 後，進行 RT-PCR 反應。依配置濃度取用 5ug 並添加適量 DEPC H<sub>2</sub>O，使總體積達到 9ul，加入 2ul Oligo dT (0.5ug/ul), 1ul 10mM dNTP，於 70 10 minutes，後移置冰上 5 minutes，添加 4ul 5X first strand buffer, 2ul 0.1 M DTT, 0.5ul RNase OUT, 0.5ul DEPC H<sub>2</sub>O, 1ul MMLV reverse transcriptase (Invitrogen, US)，37°C 至少一小時，再移置 65°C 10 minutes，可順利得到 cDNA。利用製得的 cDNA 溶液進行 PCR 擴增反應。因盤故草無相關基因可參考利用，因此，基因的選擇則以禾本科的水稻或小麥等他種作物為考量。在參考相關基因序列與文獻後，設計特殊的探針與引子，以供測試基因表現。

#### (四)抗病及防禦反應基因的基因組分析-以阿拉伯芥與水稻為例

基因對基因的專一性對應假說指出植物本身具有的抗性基因(disease resistance gene, *R*)與病原菌的致病基因(avirulence gene, *Avr*)間存在著基因對基因(gene for gene)的對應方式，且呈單一基因座的古典遺傳模式。被病原菌感染的植物細胞能產生專一辨識病原菌分泌物(elictor, *Avr* protein)，如同動物細胞抗原與抗體間的專一性辨識，使具抗性的植物細胞產生局部的過敏反應，造成細胞的死亡以抑制病原菌進一步侵染，並同時誘導防禦反應基因(defense response gene)的啟動，生成活性氧族(ROS)，同時殺死細胞與病原菌、水楊酸-一種訊號傳遞分子與離子流動(ion flow)-造成氧化態逆境(oxidative stresses)等防禦反應。

目前，已知植物可編碼多種抗病蛋白，經由不同路徑對抗病原菌的入侵，以保護植物。其中一類蛋白質的胺基酸序列含有核苷酸結合位置(nucleotide binding site, NBS)或 NB-ARC 功能區(domain)或白胺酸重複功能區(leucine-rich repeat, LRR)。許多植物抗性基因座均含有可編碼 NBS 及 LRR 功能區的鹽基序列，植物透過 NBS-LRR 蛋白辨識病原菌 *Avr* 蛋白，進而啟動防禦系統保護植物，因此分析植物基因組抗病基因座之基因序列的 NBS 及 LRR 蛋白，有助於明瞭植物抗病的分子機制。

阿拉伯芥與水稻擁有大量的數量性狀基因座(QTL)與基因表現群(gene expression profiles)等資料，應用比較基因體學的方法與技術，可以連結基因座與基因組核苷酸序列。植物的抗病基因廣泛散佈在不同染色體上，雖然無法各個確認基因座位置，但可利用病原菌感染接種方式，明瞭基因的表現模式等資料，即可明瞭植物抗病及基本防禦反應基因的種類與數量。另可由已知抗病基因的基因結構，利用生物資訊技術，如連結水稻 *Oryzabase* 與 *Gramene* 等資料庫，尋求相關抗病基因的種類與訊息，提供日後抗病基因的利用與選殖參考。

NBS 普遍存於原核生物及真核生物多種蛋白的功能區，其生物生化功能與

ATP 及 GTP 結合有關。分析胺基酸序列中有多處保守區域(conservation)，其中最強區域(motif)，為磷酸結合環(phosphate-binding loop, P-loop)區域；另有四個胺基酸序列保守區域如 Kinase-2, RNBS-B(resistance nucleotide binding site-B)、GLPL 與 MHDV。NBS 基因普遍存在植物基因組中，除可編碼 NBS domain 外，在 NBS 的胺基端(N-terminus)常編碼有多種 domains，如 Toll/intereukin-1 receptor, TIR homology region, coiled-coil (CC)，有時可見 serine-rich domain。MHDV 保守區域通常接於 NBS 胺基端(C-terminus)，其後接有 LRR、C-terminal domains，或其他未知特性序列。

以現有已知基因的核苷酸序列，利用生物資訊比對技術，來搜尋作物基因組相關基因的 NBS 的數量與種類等資訊，是最可行的方式。其方法為取得多個已知基因的核苷酸序列為比對條件(query)，以 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool, nucleotide query to nucleotide database)，或 TBLASTN(translated nucleotide query to translated database)等程式進行資料庫搜尋比對，可得到不同作物種類可編碼 NBS 的核苷酸序列等相關資訊。利用分析阿拉伯芥 NBS 序列的核苷酸序列與蛋白質的經驗，可進行水稻等不同作物的分析。利用胺基酸序列的保守區域，進行選殖與片段序列定序，在水稻可獲得 144 個可編碼全長的 NBS 的核苷酸序列片段，再以 TBLASTN 搜尋水稻基因庫(Oryzbase)；依據最後所獲得的胺基酸序列的一致性(identity)，區分不同片段組，再進行相關分析。

植物遭受病原菌感染後基因的表現情形，可以分析感染部位如葉片的 RNA 或蛋白質，且明顯表現出抗病與防禦反應的基因或蛋白質。為進行此種抗病機制分析，首先必須於不同時期分別萃取不同組織及發育時期的 RNA，構築 cDNA library 與構築基因的表現資料庫(expressed sequences tags, ESTs database)，才能進行後續的分析。分析 cDNA library 的多個選殖系，應可得到能編碼相關抗病基因的結構資訊。分析結果其大部分與防禦基因反應相類似，如已知的 protein kinase, protein transporter, phosphatase, MAPK, transcript factor and pathogenesis-related protein(PR)。一般而言，依作物之不同，防禦基因的種類不同且其表現方式各異。有些防禦基因在病原菌感染初期即有表現，有的則在後期；表現持續的時間長短也有很大的差異。但整體來說，防禦基因表現在抗感性品種間沒有明顯差異，也就是不具顯著性差異，而部分抗性基因在未受病原菌感染前即有基因表現(expression)。由水稻接種病原菌後基因表現分析知，防禦基因是由抗病基因所誘導，因此，大部分防禦基因反應顯現出並未具有專一性，雖然在一些水稻感病品種會有表現上的差異，但祇是在其表現量與表現時間上有所差異而已。

目前，依規劃進行相關基因篩選，依據現有已知植物的防禦基因及其序列，選取適合的基因序列來設計特殊探針與引子，來偵測盤固草是否有該基因或基因表現情形；適合的探針與引子可以偵測到基因的表現或存在證據(圖 9)，因此，探針與引子的設計格外重要。

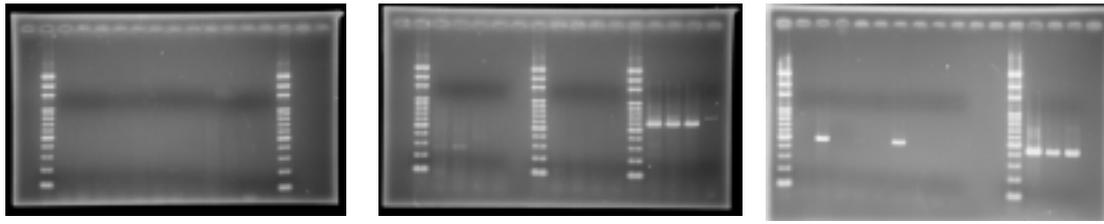


圖 9 PCR 產物的電泳分析結果

### (五)盤固草過氧化酶基因的分析

目前由於有關盤固草的研究不多，且有關抗病與防禦基因反應的資訊亦少，必須逐步建立資料。依先前研究結果可知，盤固草易罹病品系遭受銹病菌感染時，過氧化酶活性有增加的趨勢，而以陰性過氧化酶基因表現較明顯；木質素含量也有升高趨勢，顯示過氧化酶基因在遭受病原菌感染時有相當重要的防禦反應表現。

由於水稻與阿拉伯芥的基因組序列已知，有關過氧化酶基因序列亦已知，從已公佈的資訊來看，水稻擁有 138 個過氧化酶基因(Prxs)及多個退化基因，阿拉伯芥則有 73 個過氧化酶基因，分別散佈於各個染色體上，而其過氧化酶基因具多樣性功能，與植物的生長發育息息相關。基因表現型態呈現多基因家族(multi-genes family)，就目前已知，許多基因都是以基因家族方式存在，顯示基因的多功能性與重要性。水稻與盤固草同屬禾本科，因此可利用已知的水稻過氧化酶基因或其他禾本科作物的基因來進行研究。依據水稻基因組可知，水稻的過氧化酶基因雖然分散，但有些基因則緊密分布在一起，形成一基因群聚(gene cluster)的情形(表一)，以第一、三、六與七條有較高群聚數目，群聚群內有較多基因數目。藉由分析群聚內各個基因序列，基因間鹽基排列非常類似，由基因結構可視為共同保守區域，可能是具有相同的功能區域，顯示基因的可能源於共同祖先(圖 10)。同一群聚內基因具有很高的同源性與相同序列區域(表二)，顯示基因可能因複製(duplication)而造成多基因的演化。據此結果，選定各個不同染色體上 Prx 基因，設計特殊的引子，進行基因偵測與表現模式。

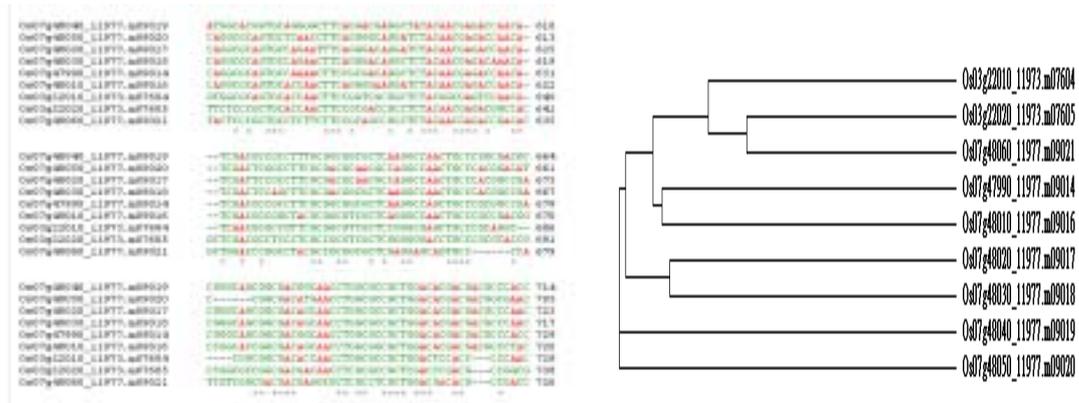


圖 10 水稻之群聚過氧化酶基因間鹽基序列相似性與親緣關係

本研究篩選多個分別位於不同染色體的過氧化酶基因，分別搜尋下載其詳細基因序列，依據各個基因結構特性，設計多組不同序列位置的引子，進行 PCR 擴增，基因的選殖與測試。同一基因序列利用軟體設計適宜多對引子，進行基因表現偵測，期能搜尋與水稻或其他植物相關同源的基因。

表一 水稻過氧化酶基因在各個染色體上分佈與群聚統計情形

染色體位置	基因數目	基因群聚數目
1	23	4
2	9	1
3	19	4
4	13	1
5	11	2
6	18	3
7	23	3
8	3	1
9	4	1
10	6	2
11	5	1
12	4	1

表二 水稻過氧化酶基因序列比對之同源性(%)

Gene	<i>Prx 41</i>	<i>Prx 40</i>	<i>Prx109</i>	<i>Prx 110</i>	<i>Prx 111</i>	<i>Prx 112</i>	<i>Prx 113</i>	<i>Prx 114</i>	<i>Prx 115</i>
<i>Prx 41</i>	100	57.9	63.7	63.3	57.2	60.7	58.4	59.6	51.2
<i>Prx 40</i>	57.9	100	57.0	57.0	52.9	54.1	53.8	52.1	58.9
<i>Prx 109</i>	63.7	57.0	100	71.2	71.9	73.8	67.6	67.7	52.9
<i>Prx 110</i>	63.3	57.0	71.2	100	72.8	75.6	68.8	81.5	51.1
<i>Prx 111</i>	57.2	52.9	71.9	72.8	100	89.3	72.4	78.9	50.5
<i>Prx 112</i>	60.7	54.1	73.8	75.6	89.3	100	71.9	75.9	51.7
<i>Prx 113</i>	58.4	53.8	67.6	68.8	72.4	71.9	100	75.6	47.2
<i>Prx 114</i>	59.6	52.1	67.7	81.5	78.9	75.9	75.6	100	47.5
<i>Prx 115</i>	51.2	58.9	52.9	51.1	50.5	51.7	47.2	47.5	100

#### 四、建議事項

此行赴美研習期間適逢美國冬季最嚴寒時節，室外溫度常低於零下 20-30°C，研究用材料生長與培育狀況差，有關田間的調查與觀察研究，因此無法進行，有些遺憾！期待下次能有更充分的時間(較長的時間)，適當的季節，進行不同季節的研習。

經由此次美國研習，獲致許多有關植物抗病基因的選殖經驗與操作技術，期待未來能成功選殖出有用基因，並加以利用與調控植物本身所具有的抗病系統來增強及提高對病害的抗性，更期待能再有機會研習有關生物資訊的技能，以強化基因表現與調控的研究。