

水稻蛋白磷解酶 2Ac-2 負向調控滲透壓逆境抗性機制之探討

邱靖雯¹、林書增²、侯新龍³、黃文理^{4*}

投稿日期 2014 年 7 月 15 日；接受日期 2014 年 8 月 5 日

摘要

本研究目的是藉由過量表現 *OsPP2Ac-2* 基因水稻轉殖細胞系，觀察在滲透壓逆境下細胞之生長情形，並以 Nitroblue tetrazolium (NBT) 與 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) 染色，探討 *OsPP2Ac-2* 基因與氧化逆境之相關性。結果顯示在水稻幼苗期 *OsPP2Ac-2* 基因表現有受滲透壓逆境抑制之趨勢，以農桿菌轉殖法於水稻中過量表現 *OsPP2Ac-2* 基因，在含 hygromycin 抗生素之篩選培養基中增生新的細胞團，以轉殖細胞系為計算標準其轉殖效率約為 13%。以 PCR、南方墨點分析與即時定量 PCR 分析均證明為 *OsPP2Ac* 基因過量表現轉殖細胞系；Ox55 及 Ox89 兩個轉殖細胞系培養於有或無添加 0.3 M sorbitol MSD₂ 培養基中，與未轉殖之 TNG67 一樣，均有隨培養天數增加細胞量逐漸增加的趨勢，唯轉殖細胞系於滲透壓處理下之細胞增殖與生長速率均有因對逆境更加敏感而減緩的趨勢。且逆境處理下 Ox89 轉殖細胞系 NBT 藍色染色最深，而 DAB 黃褐色染色最淡，顯示轉殖細胞系有較多超氧陰離子累積與較少的過氧化氫形成，推測可能與超氧岐化酶活性降低有關。綜合上述結果顯示 *OsPP2Ac-2* 基因可能負向調控水稻於非生物逆境下之耐逆境相關下游基因之表現有關。

關鍵字：水稻、蛋白磷解酶 2Ac-2、滲透壓逆境、負向調控

¹ 國立嘉義大學農藝學系碩士班研究生

² 國立嘉義大學農藝學系碩士

³ 國立嘉義大學農藝學系副教授

⁴ 國立嘉義大學農藝學系教授

* 通信作者， E-mail: wluhuang@mail.ncyu.edu.tw

前言

植物常藉由蛋白質之磷酸化與去磷酸化來調節細胞內酵素之功能，其為調控植物生長發育與對環境逆境耐受性之重要機制 (Cho and Xu, 2007; He *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2004)。磷酸化主要是藉由蛋白激酶(protein kinase, PK)活化酵素之作用，而去磷酸化則藉由蛋白磷解酶，使酵素失去活性。在傳統的研究領域中，通常認為 PK 起主要作用，而蛋白磷解酶的功能只是 PK 的反向作用，然而隨著研究的深入發現，要穩定維持蛋白質分子磷酸化水平既依賴於 PK，在真核生物中也深受蛋白磷解酶的調節，說明了這兩種酵素在調節細胞生理功能中同樣的重要 (Cohen, 1989; Ingebritsen and Cohen, 1983)。

蛋白磷解酶依序列相似性、結構、與催化功能(catalytic function)不同可分成三大家族，最大的家族是絲氨酸/蘇氨酸磷解酶(protein serine/threonine phosphatase, PP, EC 3.1.3.16)，其次為酪氨酸蛋白磷解酶(protein tyrosine phosphatase, PTP, EC 3.1.3.48)及天門冬氨酸蛋白磷解酶(protein aspartate-based phosphatase)，後者為兼具 PP 與 PTP 特性之磷解酶(dual specificity phosphatase; DSP)，均可經由訊息傳遞系統調控細胞生長與分化(Singh *et al.*, 2010; Smith and Walker, 1996)。PP 依據不同結構特異性及對特定抑制劑不同的敏感性可分為 PP1 及 PP2 (Ingebritsen and Cohen, 1983)。PP1 對哺乳動物磷酸化激酶的 β 次單元的去磷酸化活性較高，且不受 I-1 與 I-2 (inhibitor-1、2) 的抑制；PP2 對磷酸化激酶 α 次單元的活性較高，且不受 I-1、I-2 的抑制，此酶的催化次單元可單獨存在，無需固定的調節次單元相結合 (Cohen, 1989)。PP2 又按照次單元的結構、活性及對二價陽離子的依賴而被進一步分為三個亞群：PP2A、PP2B 及 PP2C。所有的 PP2A 均由一個催化次單元(catalytic subunit; PP2Ac)

和一個結構次單元 A(scaffolding subunit A, PP2Aa)組成其核心，PP2A 核心酶包含有 65 kDa 的結構次單元和 36 kDa 的催化次單元 PP2Ac，PP2A 為了得到特定基質的完整酵素活性，因此會與多樣化 50-130 kD 的調控次單元(regulatory subunit B, PP2Ab)結合形成異質三元複合體(Cho and Xu, 2007)。多數物種中還另含一個調節次單元，此調節次單元分 B 、 B' 、 B'' ，以及 B''' 四個類型，其中 B' 又包括 α 、 β 、 γ 、 δ 等次單元，PP2A 的活性不依賴於二價陽離子(McCright *et al.*, 1996; Millward *et al.*, 1999; Tehrani *et al.*, 1996; Virshup, 2000; Wera *et al.*, 1995)；PP2B 是唯一依賴於 Ca^{2+} /Calmodulin 的蛋白磷解酶，由一個催化次單元和一個調節次單元構成；PP2C 是一種單體蛋白磷解酶，其活性需依賴 Mg^{2+} (Shenolikar and Ingebritsen, 1984)。由於 PP2A 複雜的空間結構、受質特異性 (substrate specificity) 和組織特異性，其在信號傳遞中的作用極其重要和錯綜複雜 (Janssens *et al.*, 2007; Sontag, 2001; Xu *et al.*, 2006)。

植物的 PP2A 參與許多細胞生理功能反應，例如調控細胞週期、訊息傳遞途徑、控制細胞生長發育等(Janssens and Goris, 2001; Lechward *et al.*, 2001; Virshup, 2000)；學者在阿拉伯芥以 GUS 組織化學染色法，測得 PP2A 之表現位置，地上部與地下部皆有反應，地上部包含葉片、維管束、保衛細胞和花藥，地下部則在根或根尖，細胞內表現位置則為細胞核和細胞間隙 (Xu *et al.*, 2007; Pernas *et al.*, 2007; Michniewicz *et al.*, 2007)。

植物 PP 在植物生長發育及逆境信號傳遞中具重要調節作用，阿拉伯芥中已分離出 5 個 PP2A 催化次單元 C 的基因、3 個結構次單元 A 的基因、2 個調節次單元 B 的基因、4 個調節次單元 B' 的基因和 2 個調節次單元 B'' 的基因 (Haynes *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1996)。其中轉譯為 PP2A 次單元 A 的 RCN1 和調節次單元 B'' 的 TON2

分別被證明參與生長素、ABA 和乙烯的信號傳遞與調控植物藍光受體 phototropins 2 (Camilleri *et al.*, 2002; Kwak *et al.*, 2002; Larsen and Cancel, 2003; Tseng and Briggs, 2010)。PP2A 與生長素運輸有顯著相關性，其在胚與幼苗發育佔有重要影響，PP2A 結構次單元 A 去磷酸化調控生長素轉出載體蛋白(PIN) (Friml *et al.*, 2004)，PP2A 失去功能時，PIN 無法被磷酸化，PIN 的極性表現被抑制，其極性表現位置會轉移，由基部轉到頂端，亦會影響到生長素的運輸累積情形，皆使幼苗生長與根發育發生異常缺陷(Ballesteros *et al.*, 2013; Kleine-Vehn *et al.*, 2009; Michniewicz *et al.*, 2007)。

PP2A 在黃苔素(brassinosteroid, BR)訊息傳導途徑中，其調控次單元為 B' 類型，其於傳導路徑的角色有兩種情形，可分別為植物體內存在與不存在 BR 訊息參與，若無 BR 訊息存在時，BIN2 (brassinosteroid insensitive-2) 就會進行磷酸化 BRs 轉錄因子，PP2A 會去磷酸化 BR 轉錄因子，保護其不被降解，促進 BZR1 進入細胞核結合至基因上，使受 BR 誘導基因表現；而有 BR 訊息存在時，受 BRI1 (brassinosteroid insensitive 1)刺激活化的 SBI1 (suppressor of BRI1) 會在細胞質內甲基化 PP2A 的催化次單元 C，使其活化和專一性，PP2A 則會去磷酸化 BR 受體 BRI1，BR 受體會失去活性，以維持體內 BR 平衡 (Di Rubbo *et al.*, 2011; Vert *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2011)。

水稻中被選殖出 5 個 PP2A 催化次單元 C 基因 (*OsPP2Ac-1*、*OsPP2Ac-2*、*OsPP2Ac-3*、*OsPP2Ac-4* 和 *OsPP2Ac-5*)，其中 *OsPP2Ac-1* 和 *OsPP2Ac-3* 在水稻的莖、花和葉片中均表達，*OsPP2Ac-1* 在根中表達，但 *OsPP2Ac-3* 在根中無表現。乾旱和高鹽使 *OsPP2Ac-1* 和 *OsPP2Ac-3* 在葉片中的表現提升，熱逆境誘導 *OsPP2Ac-3* 在各組織中表現，然而卻抑制 *OsPP2Ac-1* 在莖中的表現；這些結果顯示，*OsPP2Ac-1* 和 *OsPP2Ac-3* 受發育和逆境的調控 (Yu *et al.*,

2003)。PP2A 基因家族龐大，其針對不同生理功能之調控機制仍未完全釐清，因此本試驗擬利用水稻 *OsPP2Ac-2* 過量基因表現轉殖細胞系為材料，以 Real-time PCR 基因分析、懸浮細胞生長情形及 DAB 與 NBT 呈色分析，來探究該基因與非生物逆境之相關性及其可能之生理功能。

材料與方法

一、水稻植株栽培與逆境處理

水稻臺農 67 號 (*Oryza sativa* L. cv. TNG67) 的種子於 37°C 進行催芽兩天後，種植於木村氏水耕液中，置於 28°C 培養室兩週後(約 3~4 葉齡幼苗期)，將幼苗以 300 mM sorbitol 處理 1 天、3 天與回復水耕液後 3 天，取其地上部，迅速以液態氮固定，保存於 -80°C 中備用。

二、水稻 *OsPP2Ac-2* 於不同逆境處理中之基因表現分析

本試驗以即時定量聚合酶連鎖反應 (quantitative real time polymerase chain reaction; qRT-PCR) 分析 *OsPP2Ac-2* 基因之表現，所使用之引子序列 (如表 1) 依據 3'-UTR 特異性序列設計，試驗並以 Ubiquitin 基因作為內部對照。

1. RNA 純化

將固定之水稻樣品以液態氮研磨後，置入 1.5 mL 離心管中，加入 500 μL 之 Trizol (Invitrogen) 試劑，室溫下靜置 5 分鐘；再加入 200 μL 氯仿，充分混合後以 4 °C 離心機 11,000 g 離心 15 分鐘。吸取上清液移至新的離心管中，加入等體積 isopropanol，混合均勻後以 4 °C 離心機 11,000 g 離心 5 分鐘，移除上清液後用 70% 酒精清洗，靜置乾燥。RNA 以滅菌之 DEPC (diethyl pyrocarbonate) 水溶解後，再以 TURBO DNA-free TM kit (Ambion) 處理以去除樣品中之殘留 DNA，測定 RNA 濃度後，保存於 -80°C 冰箱中備

用。上述 RNA 樣品以 MMLV Reverse Transcriptase 1st strand cDNA Synthesis Kit (Promega)，進行 cDNA 合成 (complementary DNA synthesis)，並將合成後的 cDNA 保存於-20°C 冰箱備用。

2. Quantitative real time PCR (qRT-PCR) 分析

本試驗每樣品取上述合成的 1st strand cDNA 為模板，進行擴增反應 (Illumina Eco Real Time PCR System)，PCR 程式設定流程為起始變性溫度為 94°C 3min；變性溫度 94°C 30 sec、煉合溫度 58°C 30 sec、延展溫度 72°C 1 min，進行 40 個循環，最後進行資料分析。本試驗以 *Ubiquitin* 作為內部對照基因 (Internal Control)，而基因表現量以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值來比較。

三、*Ubi::OsPP2Ac* 轉殖載體構築與水稻轉殖

1. Genomic DNA 純化

取 TNG67 幼嫩葉片以 Urea 法進行 Genomic DNA 純化，取適量水稻葉片加入液態氮，在研鉢中磨成粉狀移入 1.5 mL 離心管，加入與粉末等體積的 Urea extraction buffer (7 M urea; 0.3 M NaCl; 50 mM Tris-HCl; 20 mM EDTA; 1% sarkosin, pH 8.0)，充分混合後，再加入等體積的 phenol/ chloroform (pH 6.7~7)，混合均勻後置於室溫中 5 分鐘，再以 11,000 g 離心 6 分鐘，將上清液移入 1.5 mL 離心管中，加入等體積預冷之 isopropanol 緩慢上下翻轉直到有白色絲狀懸浮物出現為止，以 11,000 g 離心 5 分鐘，倒掉上清液，分別以 70%、100% 酒精清洗沉澱物，萃取之 DNA 以 50 μL 無菌水溶解，測量其 DNA 濃度後保存於 -20°C 備用。

2. *OsPP2Ac-2* 選殖與 *Ubi::PP2Ac-2* 載體構築

從 NCBI 資料庫 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 搜尋 *OsPP2Ac-2* mRNA (accession number: AC135563)，根據序列設計專一性引子，其中 5' 端引子含有 *Pst* I (CTGCA/G) 限制酵素切位，3' 端引子含有 *EcoRV* (GAT/ATC) 限制酵素切位。TNG67 cDNA 利用上述引子進行 PCR 反應後，將目標條帶切下，膠體以 Gel Elution Kit (Genemark) 回收純化。回收純化後的 DNA，使用 yT&A cloning Kit (Yeastern Biotech) 進行目標序列選殖，並轉型至大腸桿菌 XL1-blue 勝任細胞，挑取白色單一菌落以限制酶及 PCR 初步確認質體 DNA 接合情況後送交生物技術公司定序。以限制酵素 (*Pst* I / *EcoRV*) 同時處理確認序列無誤之質體 DNA 及含玉米啟動子 *Ubiquitin* 基因之 pBS 質體 DNA (Fig. 2)，將 *OsPP2Ac-2* 序列接合至 pBS 質體 DNA 後，再將確認完成的質體 DNA 以限制酶處理後，再與雙偶型載體 pSMY1H 進行接合反應，並轉型至 EHA101 農桿菌菌系，挑取生長在含適當抗生素培養基之單一菌落，純化質體 DNA 並以限制酶與 PCR 確認。

3. 水稻轉殖

本試驗以農桿菌轉殖法進行水稻 TNG67 轉殖，挑取上述已確認之 EHA101 單一菌落培養於 3 mL 含適當抗生素 LB 液體培養基中，於 28°C 震盪培養隔夜，取 100 μL 菌液加入 40 mL 含抗生素 AB 液體培養基中 28 °C 培養 12 小時，然後再加入 100 μM acetosyringone (AS) 及 5% glucose，繼續在 28°C 振盪培養 4 小時，於 4°C 離心機下，以 8,000 g 離心 10 分鐘，並去除上清液，再以含 100 μM AS 的 5 mL MS 液體培養基懸浮菌體。將先前

準備好的水稻癒合組織與菌液共培養 (co-cultivation) 5~10 分鐘，再將癒合組織移到 2N6-AS 培養基上，於 28°C 暗培養 3 天。取出癒合組織於錐形瓶中，以無菌水清洗後，加入 100 mL MSD₂ 液態培養基 (含 300 mg/L cefotaxime)，振盪培養 1~2 小時，重複數次至 MS 液態培養基乾淨為止，取出癒合組織於已消毒的濾紙上吸乾殘留的液體培養基，將癒合組織平鋪於含 50 mg/L hygromycin 與 250 mg/L cefotaxime 之篩選培養基上，培養在 28°C 全日光照下生長箱內，約 30 天後可得到轉殖成功癒合組織；將可在篩選培養基中增殖之癒合細胞分別進行繼代培養，可建立水稻轉殖系 (Wu *et al.*, 2011)。

四、轉殖癒合細胞系確認

將上述轉殖癒合細胞以上述 Urea 方法進行 DNA 純化。本試驗以抗生素抗性基因 (*hygromycin phosphotransferase, HPT*) 及南方墨點轉漬法 (Southern blot)，來確認水稻轉殖細胞系及其插入套數。

1. Genomic DNA PCR 分析

引子序列如 Table 1，PCR 起始變性溫度為 94°C 3 min；變性溫度 94°C 30 s、煉合溫度 58°C 1 min、延展溫度 72°C 1.5 min，進行 35 次循環後，再以 72°C 反應 7 min 進行最後延展反應。PCR 擴增之產物以 1% 瓊脂凝膠進行電泳分析後，將膠片置於波長 302 nm UV 燈下觀察並照相。

2. 南方墨點法分析

將上述材料純化之 DNA 進行南方墨點法分析，先取 10~15 µg DNA 利用約 30 units 的 *Pst* I 限制酶，總體積為 30 µL，於 37°C 作用 4~5 小時，於 0.8% 洋菜膠體中以 15V 進行電泳，約 14~16 小時。電泳完成後，將膠體浸泡於 0.2 N HCl 中 10 分鐘，以 H₂O 沖洗

後，將膠體浸泡在 denaturation solution (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) 中，以 45 rpm 輕微振盪 2 小時。以 H₂O 沖洗後，將膠體浸泡在 neutralization solution (0.5 M Tris-HCl pH8.0, 1.5 M NaCl) 中，以 45 rpm 輕微振盪 2 小時，藉由鹽橋的毛細作用促使 DNA 轉漬至 nylon membrane 上。轉漬隔夜後，取出 nylon membrane 於 80°C 烘箱中烘烤 90 分鐘，固定 DNA 於 nylon membrane 上後，固定完成的 nylon membrane 放入長柱血清瓶中，先利用 wash buffer I (2X SSC, 0.1% SDS) 預濕，並加入 5 mL DIG Easy Hyb，再加入沸水煮 5 分鐘、冰浴 5 分鐘 200 µL 的鮭魚精子 DNA，置於 68°C 恆溫箱中進行預雜合 2 小時。再將 3~5 µL 已在 98°C 的水浴中作用 10 分鐘，置於冰上 5 分鐘的探針加入含有預雜合好 nylon membrane 的長柱血清瓶中，置於 68°C 恆溫箱中進行雜合作用至隔天。取出 nylon membrane 以 wash buffer I (2X SSC, 0.1% SDS)，在室溫下以 45 rpm 清洗 10 分鐘，再以 wash buffer II (0.1X SSC, 0.1% SDS)，於 68°C 恆溫箱清洗兩次，每次 30 分鐘。接著在 washing buffer (1X maleic acid buffer, 0.3% Tween-20) 中浸潤 5 分鐘，然後將 nylon membrane 置於乾淨的長柱血清瓶中，並加入 5 mL blocking solution (0.5 mL blocking, 4.5 mL maleic acid buffer)，於室溫下振盪 2 小時。再加入 0.3 µL anti-Digoxigenin-AP 於長柱血清瓶內，在室溫下振盪作用 30 分鐘。作用結束後將 nylon membrane 取出，並以大量的 washing buffer 清洗 3 次，每次 15 分鐘。接著以 20 mL 的 detection buffer (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH 9.5) 作用 5 分鐘。然後將 200 µL CDP-Star solution 滴在乾淨的夾鏈袋內。再將轉漬膜正面朝下倒蓋在夾鏈袋上，並且避光作用 5 分鐘，利用封口機封邊，最後利

用固定塑膠板固定 nylon membrane 和底片壓片 1 小時，並且利用稀釋 10 倍的顯影液和定影液浸泡到底片有圖像產生。

五、水稻懸浮細胞於不同條件下之生長曲線調查及基因表現分析

取 1 mL 懸浮細胞置於含有 50 mL MSD₂ 液態培養基之 125 mL 長臂三角錐瓶內，MSD₂ 液態培養基 (MS 基礎培養基添加 2 mg/L 2,4-D) 分別有含 300 mM sorbitol (MSD₂S₃) 與無添加 (MSD₂S₀)。懸浮細胞有 TNG67、OxPP2Ac-2-55 (Ox55) 與 OxPP2Ac-2-89 (Ox89) 兩個過量表現轉殖細胞系。將其培養於此兩種培養基，每一處理重複為三，以 125 rpm 振盪轉速培養，於第 0、5、10、15、20 天測量細胞沉降體積 (packed cell volume, PCV)，且繪製細胞生長曲線。為確保轉殖細胞系增生之細胞團基因型之一致性，於兩個過量表現轉殖細胞系培養基中，均含有 50 mg/L hygromycin。另外，於第 0、5 天收取 300 mM sorbitol 處理後的懸浮細胞，將上述材料進行 RNA 純化 (方法同上述)，後續以 qRT-PCR 分析其基因表現。

六、不同條件下生長之水稻懸浮細胞 DAB 與 NBT 染色

Nitroblue tetrazolium (NBT) 能與逆境誘導產生的超氧化陰離子 (superoxide; O₂^{-·}) 結合形成藍色 formazan 化合物 (Romero-Puertas *et al.*, 2004)；而 3,3'-diaminobenzidine (DAB) 則會與活性氧族中的過氧化氫 (hydrogen peroxide; H₂O₂) 結合形成紅棕色之化合物 (Thordal-Christensen *et al.*, 1997)，兩者均可以肉眼直接觀測，可作為氧化逆境嚴重程度之指標。上述水稻懸浮細胞於 MSD₂S₀ 及 MSD₂S₃ 培養至第 20 天時，收取其懸浮細胞進行 NBT 呈色分析，將懸浮細胞放置 1.5 mL 離心管內，並分別加入 0.25 mM

NBT (NBT 溶於 50 mM K-phosphate buffer, pH 7.8) 與 DAB 染液 (1 mg/mL DAB-HCl, pH 3.8)，置於室溫下光照反應處理 24 小時後，即可觀察懸浮細胞之 NBT 與 DAB 呈色結果並拍照紀錄 (Barcelo, 1988)。

結果

一、水稻幼苗滲透壓逆境處理下之外表型與 OsPP2Ac-2 基因表現

試驗首先觀察水稻 TNG67 四葉齡幼苗在含 300 mM sorbitol 的木村氏水耕液中處理 3 天與恢復後 3 天之外表形態變化，結果顯示葉片於 sorbitol 處理後第一天即呈現明顯捲曲，第三天時葉片捲曲程度更為嚴重，並開始呈現枯黃 (Fig. 1a)，而在恢復一般水耕液培養 3 天後，葉片捲曲程度明顯改善。以定量 real-time PCR 分析水稻幼苗地上部 OsPP2Ac-2 基因之表現，結果顯示幼苗經逆境處理 24 小時後，其基因表現量明顯下降，於處理 3 天後的表現量與處理後一天相近，分析恢復後 3 天之基因表現，OsPP2Ac-2 表現量則有恢復至逆境處理前的趨勢 (Fig. 1b)。此結果顯示，OsPP2Ac-2 表現有受滲透壓逆境抑制的現象。

二、pUbi::OsPP2Ac-2 水稻轉殖系之分子鑑定分析

為了解 OsPP2Ac-2 基因與滲透壓逆境耐受性之關係，本試驗進一步構築以持續表現的玉米泛素 Ubiquitin 啟動子驅動 OsPP2Ac-2 基因、同時以 hygromycin 為篩選標誌基因 (質體以 pUbi::OsPP2Ac-2 表示；Fig. 2)，並以農桿菌轉殖法進行水稻 TNG67 基因轉殖，pUbi::OsPP2Ac-2 轉殖載體之抗生素抗性基因 (hygromycin phosphotransferase ; HPT) 進行 PCR 與南方墨點法分析，來檢測於篩選培養基上之轉殖細胞系是否轉殖成功及其轉基因套數。共進行四次農桿菌轉殖，每次約有 60 顆水

稻愈合組織，逐次依序編號後，將轉殖後可在含抗生素之篩選培養基中正常增生新的愈合組織的細胞團，移植到新的篩選培養基進行第二次篩選，並進行所有轉殖細胞系之增殖、取樣與分子生物鑑定，也同時進行轉殖植株之再生。

四次轉殖合計共有 32 個愈合組織可在含 hygromycin 抗生素之篩選培養基中持續增生新的細胞團，若以轉殖細胞系為計算標準其轉殖效率約為 13%，本研究將各轉殖細胞系進行植株再生，共獲得 14 株 T₀ 轉殖株，轉殖率為 5.8%（結果未列）。從中逢機選取 10 個轉殖細胞系進行本試驗後續檢定與分析，結果所有選殖細胞系以 HPT 引子進行 PCR，均可偵測到 975 bp 的目標條帶，反之，未轉殖對照組 TNG67 則無，初步判定均為轉殖細胞系 (Fig. 3a)。各轉殖細胞系之 DNA 進一步經 PstI 限制酵素反應後，再利用 HPT 抗性基因為探針進行南方轉漬雜合反應，結果顯示 10 個轉殖細胞系中除了編號 12 與 8 號為 2 套(含)以上的轉殖細胞系外，其餘 8 個(編號 6、7、9、13、14、55、65、及 89) 顯示為過量表現單套 *OsPP2Ac-2* 基因轉殖系 (Fig. 3b)。以上結果顯示本試驗已成功利用農桿菌轉殖法將 *pUbi::OsPP2Ac-2* 轉殖至 TNG67 水稻愈合組織中。

三、過量表現 *OsPP2Ac-2* 轉殖細胞系之 *OsPP2Ac-2* 基因表現

本研究選取兩個 *pUbi::OsPP2Ac-2* 過量表現水稻轉殖細胞系 Ox55 與 Ox89，以定量 real-time PCR 分析比較與 TNG67 *OsPP2Ac-2* 基因表現，結果顯示兩個過量表現之轉殖細胞系 *OsPP2Ac-2* 基因表現均顯著高於未轉殖之 TNG67 (資料未列)，細胞若經 300 mM sorbitol 處理 7 天後，Ox55 與 Ox89 兩個轉殖細胞系仍維持高 *OsPP2Ac-2* 基因表現量 (Fig. 4)，反之，TNG67 *OsPP2Ac-2* 基因表現量則有下降的趨勢，與幼苗期 *OsPP2Ac-2* 基因表現受滲透壓逆境抑制的趨勢一致。

四、過量表現 *pUbi::OsPP2Ac-2* 轉殖細胞系於懸浮細胞於滲透壓逆境處理下之細胞生長情形

將上述兩個過量表現 *pUbi::OsPP2Ac-2* 轉殖細胞系於篩選培養基上增生之愈合組織移入含 50 mg/L hygromycin 之 MSD₂ 培養基 (MSD₂H) 中持續繁殖至少一個月以上，每週繼代培養一次，以培育成穩定一致之懸浮細胞系。將 TNG67、Ox55 及 Ox89 分別培養於 MSD_{2S0} 及 MSD_{2S3} 培養基中，每 5 天測量其細胞增殖與生長情形，結果顯示三者於 MSD_{2S0} 及 MSD_{2S3} 培養基中，均有隨培養天數增加細胞量逐漸增加的趨勢，不過各細胞系生長曲線 (growth curve) 呈現部分差異。其中 TNG67 懸浮細胞在 MSD_{2S0} 培養基中第 5 天、10 天、15 天、及 20 天，其 PCV 分別為 3.2、7.0、6.3、6.3 mL/50 mL，即表示於第 10 天時即可達最大之細胞增殖倍數，之後就持平甚至略為下降 (Fig. 5a)，可知第 10 天後逐漸進入靜止期 (stationary phase)；當 TNG67 懸浮細胞培養於 MSD_{2S3} 培養基不同天數時，PCV 分別為 2.3、4.1、4.7、5.0 mL/50 mL，相較兩培養基之結果顯示，未轉殖之 TNG67 在 300 mM sorbitol 滲透壓處理下，細胞生長速率平均下降約 25% 左右 (Fig. 5a)。

而 Ox55 及 Ox89 兩個轉殖細胞系，培養於 MSD_{2S0} 及 MSD_{2S3} 培養基中有類似的生長趨勢，Ox55 在 MSD_{2S0} 培養基中第 5 天、10 天、15 天及 20 天，其 PCV 分別為 1.8、5.8、6.6、7.0 mL/50 mL，即表示雖於第 10 天時有快速增殖現象，之後 PCV 仍逐漸增加，一直到第 20 天才達最大之細胞增殖倍數 7.0 mL/50 mL；當其懸浮細胞培養於 MSD_{2S3} 培養基不同天數，PCV 分別為 1.5、3.3、3.8、5.0 mL/50 mL，不論是細胞實際增殖倍數或相對於 MSD_{2S0} 培養基之相對增殖速率，Ox55 轉殖細胞系於 MSD_{2S3} 培養基中之生長均有比未轉殖之 TNG67 生長減緩之趨勢 (Fig. 5b)。此種在

滲透壓逆境下，細胞之增殖與生長速率反而因對逆境更加敏感而減緩的趨勢也在 Ox89 轉殖細胞系中有類似的表現 (Fig. 5c)。

五、過量表現 *pUbi::OsPP2Ac-2* 轉殖細胞系懸浮細胞於滲透壓逆境處理下 NBT 與 DAB 染色

將於 MSD₂S₀ 與 MSD₂S₃ 培養基中培養 20 天之懸浮細胞，分別以 NBT 與 DAB 溶液染色，結果顯示 TNG67、Ox55 與 Ox89 三種懸浮細胞於不含 sorbitol 的 MSD₂S₀ 培養基中培養 20 天，不論是 NBT 與 DAB 染色均並未呈現明顯染色，顯示並未有明顯活性氧族化合物累積 (Fig. 6, Fig. 7)；反之，於含 sorbitol 的 MSD₂S₃ 培養基中，三者 NBT 染色均呈現明顯藍色，尤其是 Ox89 懸浮細胞最為明顯 (Fig. 6)，而 DAB 染色則以 TNG67 有些微之呈色反應 (Fig. 7)。

討論

植物蛋白磷解酶 (protein phosphatase; PP) 會與蛋白激酶 (protein kinase; PK) 共同調控細胞內酵素之功能，於植物生長發育及逆境訊息傳遞中具有重要的角色 (Haynes *et al.*, 1999; He *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2004)，其中以絲氨酸/蘇氨酸為主的蛋白磷解酶 2A (PP2A)，參與許多細胞生理功能反應 (Janssens and Goris, 2001; Lechward *et al.*, 2001; Virshup, 2000)。本試驗利用水稻基因體相關資料庫進行搜尋分析比對 (Hsing *et al.*, 2007, Vij and Tyagi, 2007)，選殖出 PP2A 催化次單元基因 (*OsPP2Ac-2*)，Real-time 定量 PCR 分析結果顯示，水稻幼苗 sorbitol 於逆境處理下，*OsPP2Ac-2* 基因表現明顯受滲透壓逆境抑制，其表現模式類似於乾旱與高溫逆境處理被抑制的結果 (Yu *et al.*, 2005)。推測水稻幼苗遭受逆境時，為了誘發後續對逆境之耐受性，必須活化逆境之防禦機制，例如提高抗氧化酵素活性，所以可能

藉由去磷酸化調控抗氧化酵素之上游相關蛋白，間接維持其酵素活性 (He *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2007)。

為釐清 *OsPP2Ac-2* 基因表現是否與植物對逆境之抗性呈現負向調控之關係，本試驗進一步以基因轉殖策略過量表現 *OsPP2Ac-2* 基因，觀察過量表現 *OsPP2Ac-2* 基因之水稻轉殖細胞系在滲透壓逆境處理下之懸浮細胞生長及 DAB 與 NBT 兩種針對活性氧分子之呈色分析，結果顯示正常水稻 TNG67 懸浮細胞於一般只含 2, 4-D 之 MSD₂S₀ 細胞增殖培養基中第 10 天左右，就可達到最高增殖倍數 (7 倍左右) (Fig. 5a)，而 *OsPP2Ac-2* 過量表現轉殖系之懸浮細胞於 MSD₂S₀ 培養基中雖也可達到 7 倍左右的增殖倍率，唯需於培養後第 20 天才能達到 (Fig. 5b)，顯示有較長之遲滯期 (lag phase)。當遭遇滲透壓逆境時 (MSD₂S₃ 培養基)，TNG67 懸浮細胞增殖倍率約降低 25% 左右，且不同培養天數均呈現一致的下降趨勢，沒有明顯變化，反之，Ox55 與 Ox89 兩個 *OsPP2Ac-2* 過量表現轉殖細胞系，在 MSD₂S₃ 培養基第 10 天與第 15 天時，懸浮細胞 PVC 生長量大幅降低至約 50% 左右 (Fig. 5b, 5c)，對滲透壓逆境呈現高度敏感性，到了第 20 天時有逐漸恢復的趨勢，可能是受其他 *OsPP2Ac* 同源基因的補償作用的影響 (Yu *et al.*, 2005)。此逆境下懸浮細胞生長速率的差異，也進一步證實本試驗對 *OsPP2Ac-2* 基因表現對植物逆境之抗性為負向調控之推測。

從 NBT 染色試驗分析來看，*OsPP2Ac-2* 過量表現轉殖細胞系 Ox89 之細胞於 sorbitol 逆境處理後之 NBT 藍色呈色明顯比 TNG67 深 (Fig. 6)，顯示超氧化陰離子 O₂⁻ 累積高於對照組，推測可能與超氧化歧化酶 (superoxide dismutase; SOD) 活性下降有關，是否因 *OsPP2Ac-2* 過量表現使抑制 SOD 之上游調控蛋白被去磷酸化

增加，導致活性下降，甚值得進一步分析 SOD 酶素活性來釐清。從定量 PCR 分析結果顯示此 Ox89 轉殖細胞系之 *OsPP2Ac* 基因表現明顯高於 Ox55 轉殖細胞系 (Fig. 4)，顯示此基因之表現量與 NBT 染色呈現正相關。此外，DAB 染色結果以對照組 TNG67 染色最明顯，顯示有較多的過氧化氫累積，此結果也符合上述推論；目前尚無 PP2Ac 對 SOD 酶素活性之調控或影響超氧化陰離子累積之相關報導，甚值得深入探討。

本試驗結果符合 Zhou 等人(2014) 指出黃苔素 (brassinosteroid; BR) 與逆境耐受性之相關，BR 會調控下游耐逆境性基因，增加植物之逆境耐受性，其中 BR 會誘發 RBOH1-NADPH Oxidase 活化在細胞質外產生 H₂O₂, H₂O₂進而誘導ABA產生累積，使植物對逆境反應，亦增加其耐受性。而於細胞質內之 PP2Ac 會受 SBI1 所活化，PP2Ac 進而去磷酸化 BR 受體 BRI1 (brassinosteroid insensitive 1)，BR 受體會失去活性 (Di Rubbo *et al.*, 2011; Vert *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2011)。另外，Cicchillitti *et al.* (2003) 研究結果顯示抑制 PP2A 表現會促進細胞週期於 ROS 逆境下中之 DNA 合成，反之，過量表現 PP2A 則會減緩細胞週期之進行，與本試驗結果一致 PVC 細胞生長量結果亦符合。

本試驗之結果顯示水稻 *OsPP2Ac-2* 會受逆境調控而抑制其表現量，而 *OsPP2Ac-2* 過量表現轉殖系於逆境下時，其細胞生長量與 H₂O₂累積量下降，超氧化陰離子累積量則上升，此結果與上述研究綜合推測 *OsPP2Ac-2* 在水稻正常植株遭受非生物逆境時會表現量下降，可能使耐逆境相關基因持續活化與啟動耐逆境反應機制，以增加植株於逆境之耐受性，反之過量表現 *OsPP2Ac-2* 會抑制水稻抗逆境相關基因表現與阻礙耐逆境反應機制，使細胞生長於逆境下表現敏感，但此推測途徑中，水稻 *OsPP2Ac-2* 於非生物逆境之實際運作機制仍不清楚，未來研究中需要更進一步來

釐清 *OsPP2Ac-2* 於水稻之非生物逆境中所扮演的角色與其他信號於調控過程之關係。

引用文獻

- Ballesteros, I., T. Dominguez, M. Sauer, P. Paredes, A. Duprat, E. Rojo, M. Sanmartin and J. J. Sanchez-Serrano. 2013. Specialized functions of the PP2A subfamily II catalytic subunits PP2A-C3 and PP2A-C4 in the distribution of auxin fluxes and development in *Arabidopsis*. *Plant J.* 73: 862–872.
- Barcelo, A. R. 1998. The generation of H₂O₂ in the xylem of *Zinnia elegans* is mediated by an NADPH-oxidase-like enzyme. *Planta* 207: 207-216.
- Camilleri, C., J. Azimzadeh, M. Pastuglia, C. Bellini, O. Grandjean, D. Bouchez. 2002. The *Arabidopsis* TONNEAU2 gene encodes a putative novel protein phosphatase 2A regulatory subunit essential for the control of the cortical cytoskeleton. *Plant Cell* 14: 833-845.
- Cho, U. S. and W. Xu. 2007. Crystal structure of a protein phosphatase 2A heterotrimeric holoenzyme. *Nature* 445: 53-57.
- Cicchillitti, L., P. Fasanaro, P. Biglioli, M. C. Capogrossi and F. Martelli. 2003. Oxidative stress induces protein phosphatase 2A-dependent dephosphorylation of the pocket proteins pRb, p107, and p130. *J. Biol. Chem.* 278: 19509-19517.
- Cohen, P. 1989. Protein phosphatases come of age. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 453-508.

- Di Rubbo, S., N. G. Irani and E. Russinova. 2011. PP2A phosphatases: the “on-off” regulatory switches of brassinosteroid signaling. *Sci. Signal.* 4: 1-4.
- Friml, J., X. Yang, M. Michniewicz, D. Weijers, A. Quint, O. Tietz, R. Benjamins, P. B. F. Ouwerkerk, K. Ljung, G. Sandberg, P. J. J. Hooykaas, K. Palme and R. Offringa. 2004. A PINOID-dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux. *Science* 306: 862-865.
- Haynes, J. G., A. J. Hartunga, J. D. Hendershot, R. S. Passingham and S. J. Rundle. 1999. Molecular characterization of the B' regulatory subunit gene family of Arabidopsis protein phosphatase 2A. *Eur. J. Biochem.* 260: 127-136.
- He, X., J. C. Anderson, O. D. Pozo, Y. Q. Gu, X. Tang and G. B. Martin. 2004. Silencing of subfamily I of protein phosphatase 2A catalytic subunits results in activation of plant defense responses and localized cell death. *Plant J.* 38:563-577.
- Hsing, Y. I., C.G Chern, M. J. Fan, P. C. Lu, K. T. Chen, S. F. Lo, S. L. Ho, K. W. Lee, Y. C. Wang, P. K. Sun, W. L. Huang, S. S. Ko, S. Chen, J. L. Chen, C. I. Chung, Y. C. Lin, A. L. Hour, Y. W. Wang, Y. C. Chang, M. W. Tsai, Y. S. Lin, Y. C. Chen, H. M. Yen, C. P. Li, C. K. Wey, C. S. Tseng, M. H. Lai, S. C. Huang, L. J. Chen, and S. M. Yu. 2007. A rice gene activation/knockout mutant resource for high throughput functional genomics. *Plant Mol. Biol.* 63: 351-364.
- Ingebritsen, T. S. and P. Cohen. 1983. Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. *Science* 221: 331-338.
- Janssens, V. and J. Goris. 2001. Protein phosphatase 2a: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signaling: Phosphatase 2a catalytic subunit is a negative regulator of abscisic acid signaling. *Plant J.* 51: 763-778.
- Janssens, V., S. Longin and J. Goris. 2007. PP2A holoenzyme assembly: in Cauda venenum (the sting is in the tail). *Trends Biochem. Sci.* 33: 113-121.
- Kleine-Vehn, J., F. Huang, S. Naramoto, J. Zhang, M. Michniewicz, R. Offringaand, and J. Friml. 2009. PIN auxin efflux carrier polarity is regulated by PINOID kinase-mediated recruitment into GNOM-independent trafficking in Arabidopsis. *Plant Cell* 21: 3839-3849.
- Kwak, J. M., J. H. Moon, Y. Murata, K. Kuchitsu, N. Leonhardt, A. Delong and J. I. Schroeder. 2002. Disruption of a guard cell-expressed protein phosphatase 2A regulatory subunit, RCN1, confers abscisic acid insensitivity in Arabidopsis. *Plant Cell* 14: 2849-2861.
- Larsen, P. B. and J. D. Cancel. 2003. Enhanced ethylene responsiveness in the Arabidopsis eerl mutant results from a loss-of-function mutation in the protein phosphatase 2A: a regulatory subunit, RCN1. *Plant J.* 34: 709-718.
- Lechward, K., O. S. Awotunde, W. wiątek and G. Muszyńska. 2001. Protein phosphatase 2a:

- Variety of forms and diversity of functions.
Acta Biochim. Polonica 48: 921-933.
- McCright, B., A. M. Rivers, S. Audlin and D. M. Virshup. 1996. The B56 family of protein phosphatase 2A (PP2A) regulatory subunits encodes differentiation-induced phosphoproteins that target PP2A to both nucleus and cytoplasm. *J. Biol. Chem.* 271: 22081-22089.
- Michniewicz, M., M. K. Zago, L. Abas, D. Weijers, A. Schweighofer, I. Meskiene, M. G. Heisler, C. Ohno, J. Zhang, F. Huang, R. Schwab, D. Weigel, E. M. Meyerowitz, C. Luschnig, R. Offringa and J. Friml. 2007. Antagonistic regulation of PIN phosphorylation by PP2A and PINOID directs auxin flux. *Cell* 130: 1044-1056.
- Millward, T. A., S. Zolnierowicz and B. A. Hemmings. 1999. Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends Biochem. Sci.* 24: 186-191.
- Pernas, M., G. G. Casado, E. Rojo, R. Solano and J. J. S. Serrano. 2007. A protein phosphatase 2A catalytic subunit is a negative regulator of abscisic acid signaling. *Plant J.* 51: 763-778.
- Romero-Puertas, M. C., M. Rodríguez-Serrano, F. J. Corpas, M. Gómez, L. A. Del Río and L. M. Sandalio. 2004. Cadmium-induced subcellular accumulation of O₂⁻ and H₂O₂ in pea leaves. *Plant Cell Environ.* 27: 1122-1134.
- Shenolikar, S. and T. S. Ingebritsen. 1984. Protein (serine and threonine) phosphate phosphatases. *Methods Enzymol.* 107: 102-129.
- Singh, A., J. Giri, S. Kapoor, A. K. Tyagi and G. K. Pandey. 2010. Protein phosphatase complement in rice: Genome-wide identification and transcriptional analysis under abiotic stress conditions and reproductive development. *BMC Genomics* 11: 435-473.
- Smith, R. D. and J. C. Walker. 1996. Plant protein phosphatases. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 47: 101-125.
- Sontag, E. 2001. Protein phosphatase 2A: the trojan horse of cellular signaling. *Cell. Signal.* 13: 7-16.
- Tehrani, M. A., M. C. Mumby and C. Kamibayashi. 1996. Identification of a novel protein phosphatase 2A regulatory subunit highly expressed in muscle. *J. Biol. Chem.* 271: 5164-5170.
- Thordal-Christensen, H., Z. Zhang, Y. Wei and D. B. Collinge. 1997. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley—powdery mildew interaction. *Plant J.* 11: 1187-1194.
- Tseng, T. S. and W. R. Briggs. 2010. The *Arabidopsis* *rcn1-1* mutation impairs dephosphorylation of Phot2, resulting in enhanced blue light responses. *Plant Cell* 22: 392-402.
- Vert, G., J. L. Nemhauser, N. Geldner, F. Hong and J. Chory. 2005. Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21: 177-201.

- Vij, S. and A. K. Tyagi. 2007. Emerging trends in the functional genomics of the abiotic stress response in crop plants. *Plant Biotechnol. J.* 5:361-380.
- Virshup, D. M. 2000. Protein phosphatase 2a: a panoply of enzymes. *Cell Biol.* 12: 180–185.
- Wera, S., A. Fernandez, N. J. Lamb, P. Turowski, M. Hemmings-Mieszczak, R. E. Mayer-Jaekel and B. A. Hemmings. 1995. Deregulation of translational control of the 65-kDa regulatory subunit (PR65 alpha) of protein phosphatase 2A leads to multinucleated cells. *J. Biol. Chem.* 270: 21374-21381.
- Wu, C. Y., C. Y. Hong and W. L. Huang. 2011. Transient expression of OsAKR5 gene in transgenic rice cultured cell under stress treatments. *Crop Environ. Bioinform.* 8: 153-162.
- Wu, G., X. Wang, X. Li, Y. Kamiya, M. S. Otegui and J. Chory. 2011. Methylation of a phosphatase specifies dephosphorylation and degradation of activated brassinosteroid receptors. *Sci. Signal.* 4: 1-11.
- Xu, C., R. Jing, X. Mao, X. Jia and X. Chang. 2007. A wheat (*Triticum aestivum*) protein phosphatase 2A catalytic subunit gene provides enhanced drought tolerance in tobacco. *Ann. Bot.* 99: 439-450.
- Xu, Y., Y. Xing, Y. Chen, Y. Chao, Z. Lin, E. Fan, J. W. Yu, S. Strack, P. D. Jeffrey and Y. Shi. 2006. Structure of the protein phosphatase 2A holoenzyme. *Cell* 127: 1239-1251.
- Yu, R. M. K., Y. Zhou, Z. F. Xu, M. L. Chye and R. Y. C. Kong. 2003. Two genes encoding protein phosphatase 2A catalytic subunits are differentially expressed in rice. *Plant Mol. Biol.* 51: 295-311.
- Yu, R.M., M.M. Wong, R.W. Jack and R.Y. Kong. 2005. Structure, evolution and expression of a second subfamily of protein phosphatase 2a catalytic subunit genes in the rice plant (*Oryza sativa* L.). *Planta* 222: 757–768.
- Zhou, H. W., C. Nussbaumer, Y. Chao and A. Delong. 2004. Disparate roles for the regulatory a subunit isoforms in *Arabidopsis* protein phosphatase 2A. *Plant Cell* 16: 709-722.
- Zhou, J., J. Wang, X. Li, X. J. Xia, Y. H. Zhou, K. Shi, Z. X. Chen and J. Q. Yu. 2014. H₂O₂ mediates the crosstalk of brassinosteroid and abscisic acid in tomato responses to heat and oxidative stresses. *J. Exp. Bot.* 10.1093/jxb/eru217

Table 1. Primer sequences and PCR amplicon sizes for different gene in this study.

Primer	Primer Sequence (5'→3')	Product size (bp)	Application
HPT-Fw	GCCTGAACTCACCGCGACGT	975	PCR
HPT-Rv	CGAGTGCTGGGCGTCGGTT		
OsPP2Ac-Fw	CTCACCAAGTTGGTCATGGAG	109	qRT-PCR
OsPP2Ac-Rv	CAAGATTGATGCCATGTTCC		
Ubiquitin-Fw	CGCAAGTACAACCAGGACAA		
Ubiquitin-Rv	TGGTTGCTGTGACCACACTT	160	qRT-PCR

HPT, hygromycin phosphotransferase; Fw, Forward; Rv, Reverse; PCR, polymerase chain reaction; qRT-PCR, quantitative real-time PCR.

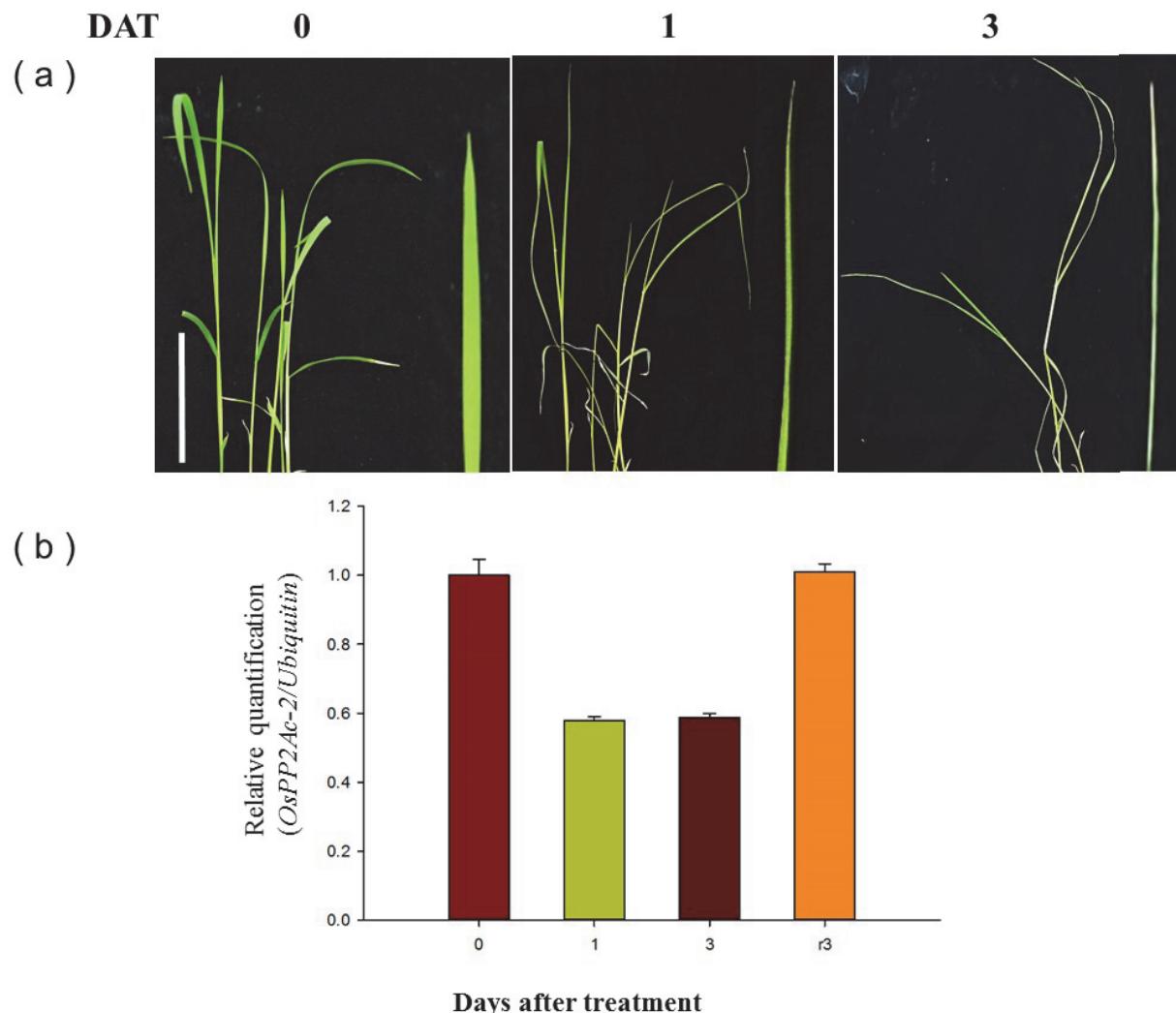


Fig. 1. Phenotypic observation and gene expression of *OsPP2Ac-2* in TNG67 seedling under sorbitol treatment. (a)The 4 leaf-age seedling grown in at Kimura hydroponic solution containing 300 mM sorbitol for 0, 1, and 3 days. then moved to Kimura solution for 3 days. (b)The shoot mRNA are used for qRT-PCR. The expression of Ubiquitin gene was used as the internal control. DAT, days after treatment; r3, recover for 3 days; Bar=5 cm。

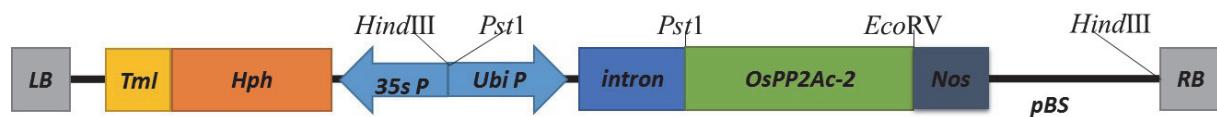


Fig. 2. *pUbi::OsPP2Ac-2* construction map. *Hph*, hygromycin phosphotransferase; RB, right border ; LB, left border 。

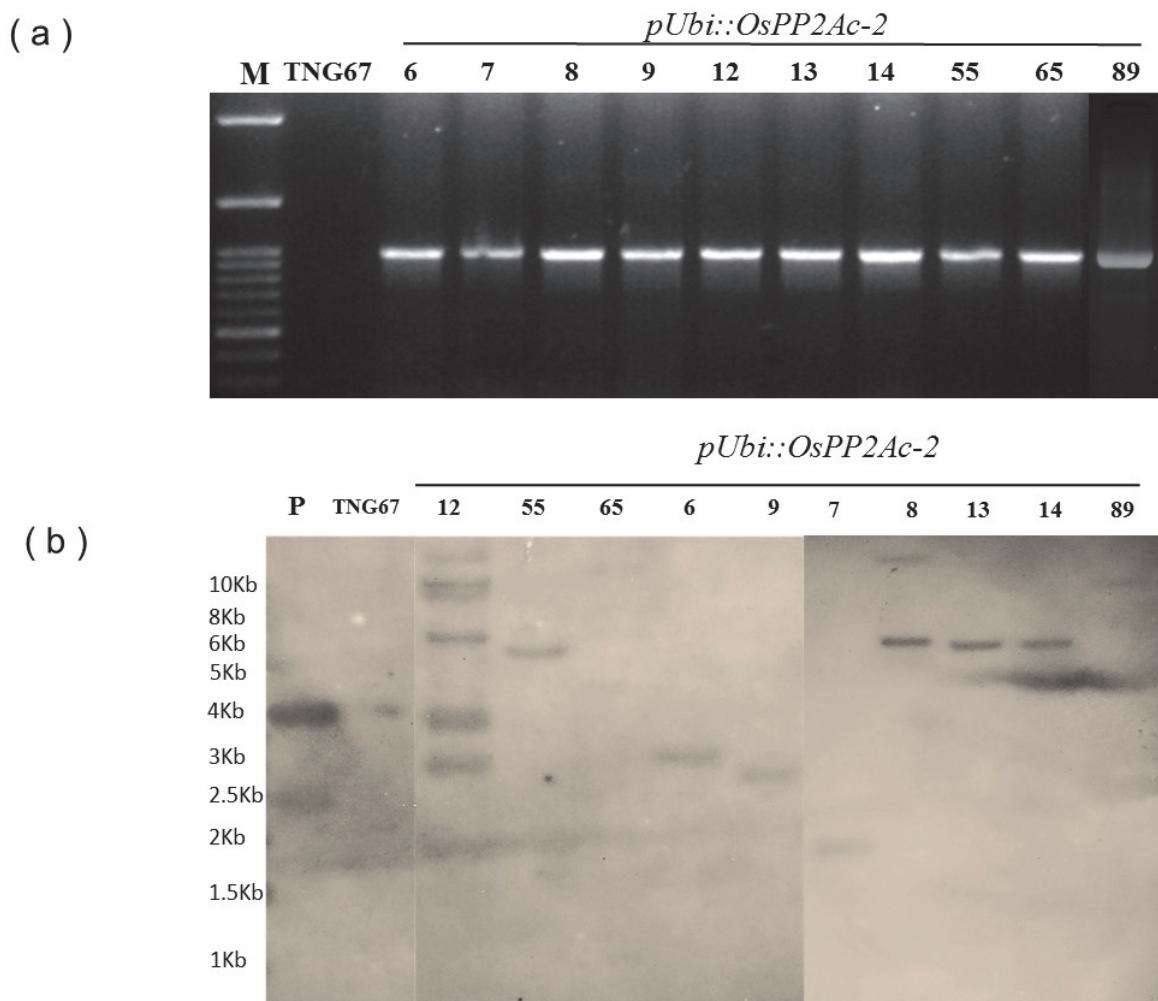


Fig. 3. Molecular analysis of transgenic rice cell lines of *pUbi::OsPP2Ac-2*. (a) Genomic PCR of HPT resistance gene. (b) Southern blot analysis. The genomic DNA was digested by *PstI* and HPT gene used as the probe. P, plasmid was used as the positive control.

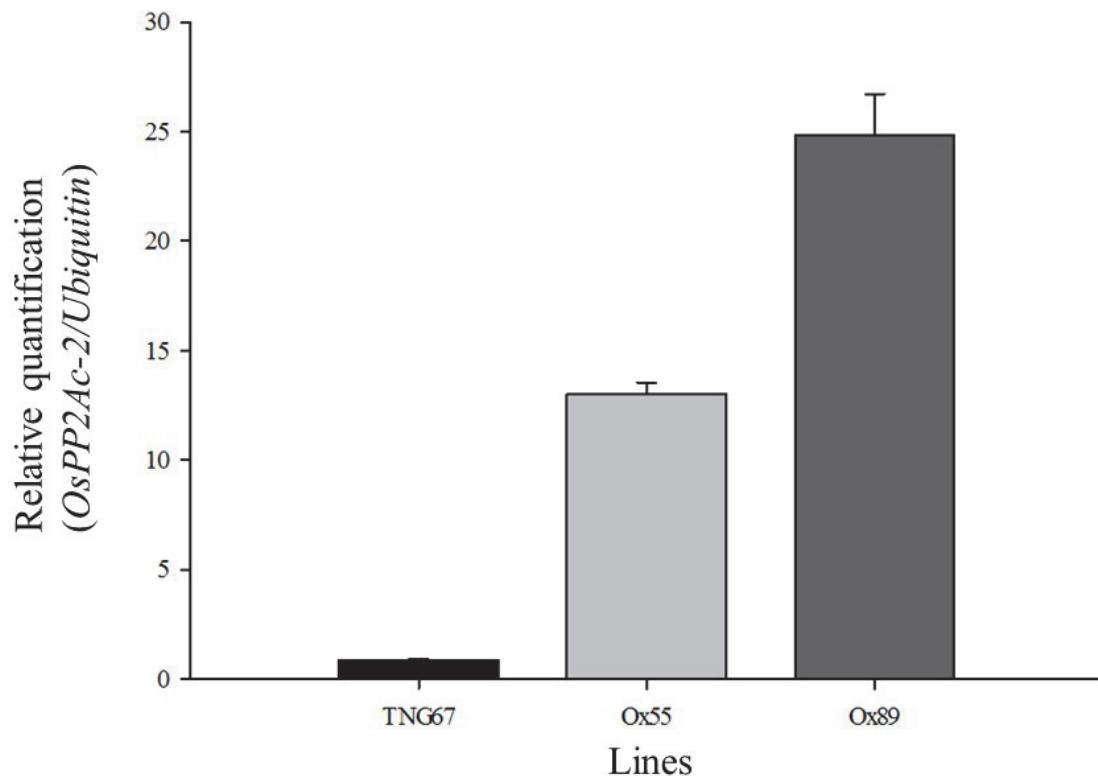


Fig. 4. qRT-PCR analysis of *OsPP2Ac-2* gene in different rice suspension cells under 300 mM sorbitol treatment. Ox55 and Ox89 are transgenic cell lines of *pUbi::OsPP2Ac-2*. The expression of Ubiquitin gene was used as the internal control.

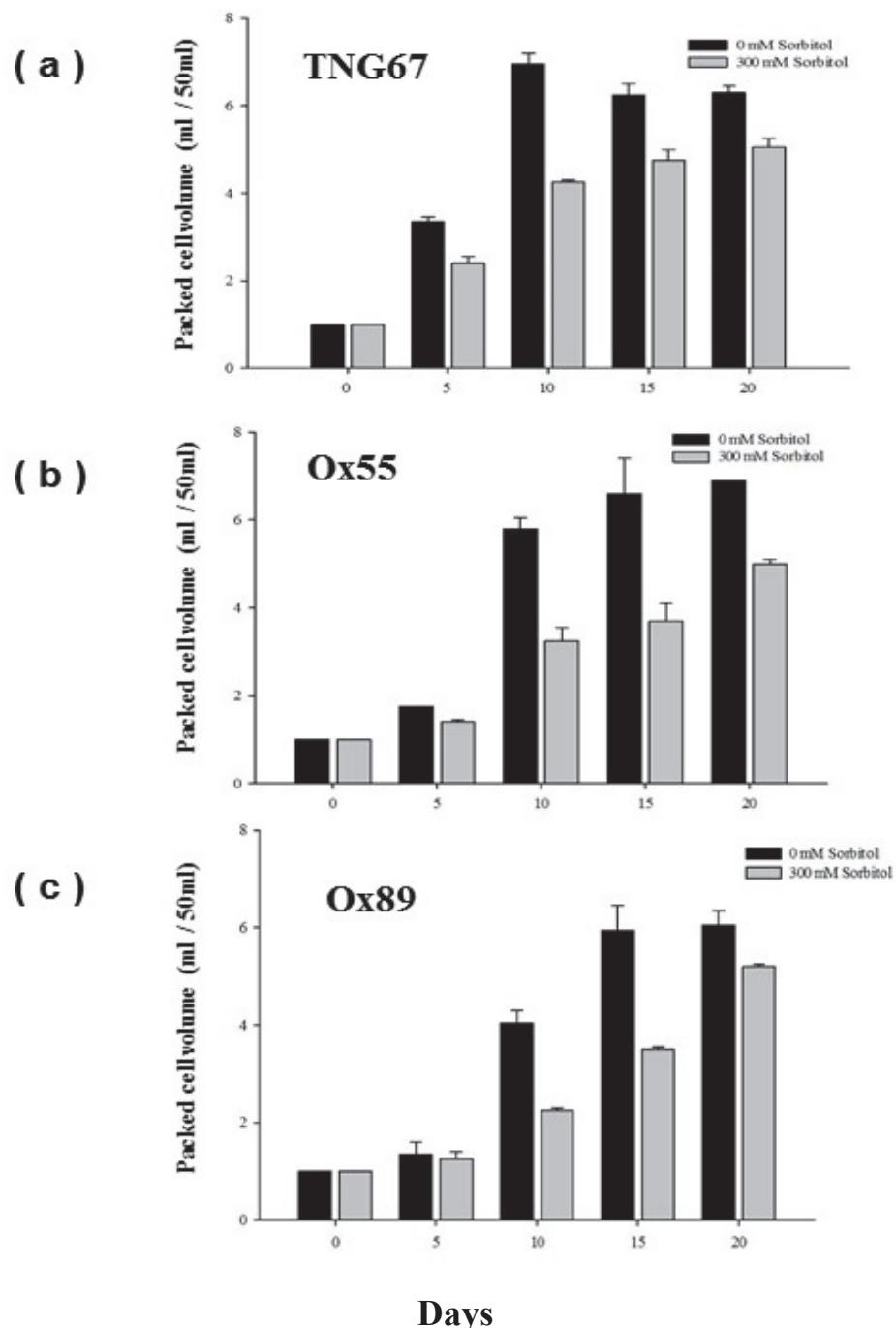


Fig. 5. Packed cell volume measurement of different rice suspension cell lines (TNG67, Ox55, Ox89) incubated in MSD_2 medium with or without 300 mM sorbitol for 20 days. Ox55 and Ox89 are transgenic cell lines of *pUbi::OsPP2Ac-2*. The suspension cell are initiated from resistance callus and amplified on selection medium containing 50 ppm hygromycin. Originally, 1 mL/50 mL suspension cell are used and PCV are measured every 5 days.

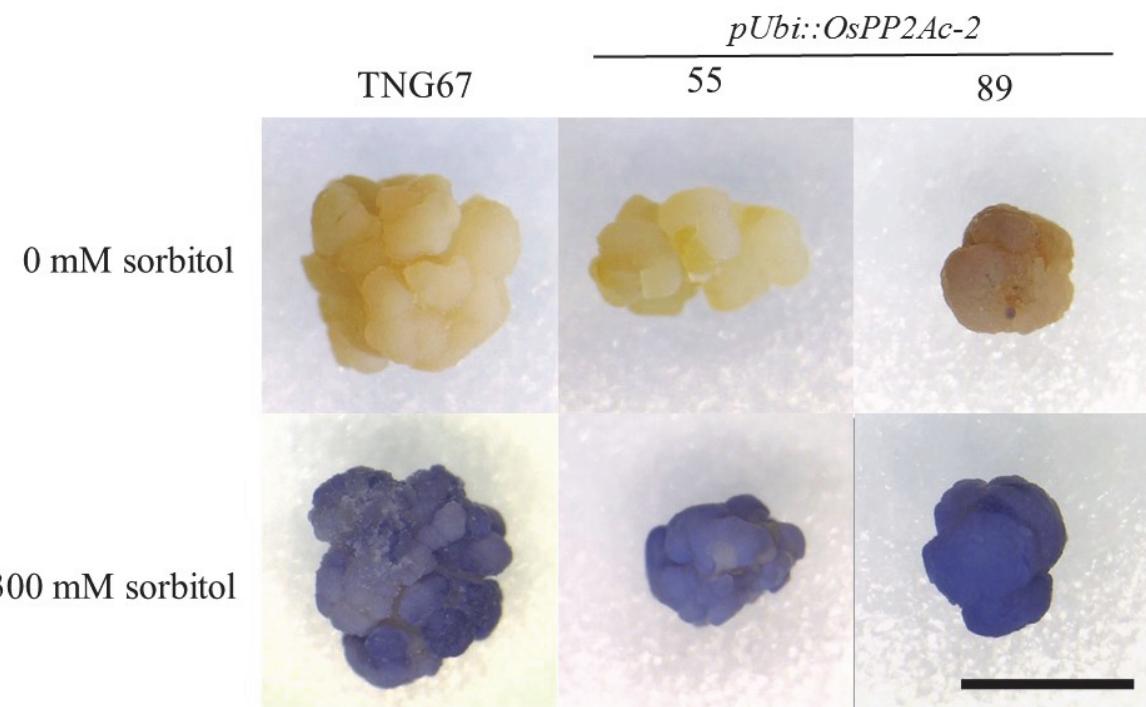


Fig. 6. NBT staining of different rice suspension cells treated with 300 mM sorbitol for 20 days. Ox55 and Ox89 are transgenic cell lines of *pUbi::OsPP2Ac-2*. Bar=0.25 cm。

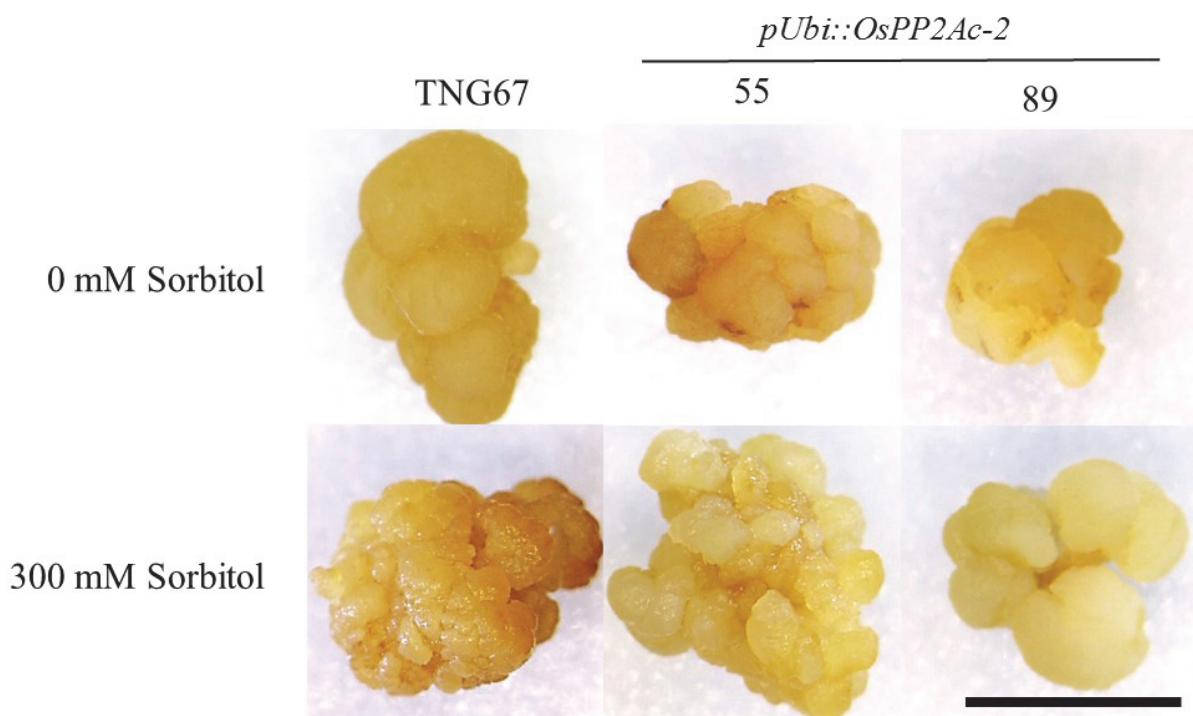


Fig. 7. DAB staining of different rice suspension cells treated with 300 mM sorbitol for 20 days. Ox55 and Ox89 are transgenic cell lines of *pUbi::OsPP2Ac-2*. Bar=0.25 cm。

The putative role of protein phosphatase 2A catalytic subunit isoform 2 as a negative regulator on osmotic stress tolerance in rice

Ching-Wen Chiu¹, Shu-Tseng Lin², Shin-Lon Ho³, Wen-Lii Huang^{4*}

Received 15 July 2014, accepted 5 August 2014

Abstract

The study aimed to understand the possible role of protein phosphatase 2A catalytic subunit isoform 2 (*OsPP2Ac-2*) on osmotic stress in rice by genetic transformation approach. The growth curve, nitroblue tetrazolium (NBT) and 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) staining of transgenic cell lines under osmotic stress treatment were determined. The results showed that *OsPP2Ac* gene expression was inhibited under sorbitol treatment at seedling stage. The transformation efficiency is approximately up to 13%. All transgenic cell lines were confirmed by genomic PCR, Southern blot and quantitative real time PCR analysis. The growth curve of two transgenic cell lines, Ox55 and Ox89, either grown on MSD₂S₀ or MSD₂S₃ medium are similar to wild type, TNG67. But their growth efficiency are significantly decreased under sorbitol treatment owing to hypersensitive to osmotic stress. Besides, The NBT stain is stronger and DAB stain is lighter in *OxOsPP2Ac-2* overexpression line, Ox89, under sorbitol treatment for 20 days than in TNG67 which may derive from higher level of superoxide and low level of hydrogen peroxide accumulation. It may cause from lower enzyme activity of superoxide dismutase in Ox89 under sorbitol treatment. We concluded that *OsPP2Ac-2* gene may act as a negative regulator for osmotic stress tolerance in rice by affecting downstream stress responsive genes. In the future, more study is necessary to clarify the possible role of *OsPP2Ac-2* gene on stress tolerance in rice.

Key words: *Oryza sativa*, Protein phosphatase 2A catalytic subunit isoform 2, Osmotic stress, Negative regulation.

¹ Graduate student, Department of Agronomy, NCYU, Taiwan (R.O.C.)

² Master, Department of Agronomy, NCYU, Taiwan (R.O.C.)

³ Associate Professor, Department of Agronomy, NCYU, Taiwan (R.O.C.)

⁴ Professor, Department of Agronomy, NCYU, Taiwan (R.O.C.)

* Corresponding Author. E-mail: [wlhuang@mail.ncyu.edu.tw](mailto:wluhuang@mail.ncyu.edu.tw)