

## 水稻癒合組織之植株再生能力與澱粉代謝的關係

黃文理<sup>1</sup> 王玉麒<sup>2</sup> 李平篤<sup>3</sup> 劉麗飛<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup> 輔英科技大學生物技術系

<sup>2</sup> 國立台灣師範大學生命科學系

<sup>3</sup> 國立台灣大學微生物與生化學研究所

<sup>4</sup> 國立台灣大學農藝學系

(接受刊載日期: 中華民國九十四年十二月十二日)

本試驗以水稻矮南早 39 (ANT39) 為材料, 觀察在癒合組織誘導與植株再生過程中, 澱粉代謝相關酵素如 ADP glucose pyrophosphorylase、starch phosphorylase, 與  $\alpha$ -amylase 之表現與組織定位。結果顯示具高植株再生能力的 ANT39-Dry 在癒合組織誘導過程中有較高澱粉與葡萄糖累積, 在植株再生初期也有較高葡萄糖累積的現象。進一步分析顯示高澱粉含量主要是因為具有較高之澱粉合成能力, 而植株再生初期較高葡萄糖含量來自於培養基吸收與細胞內澱粉分解。此外, 不論是 starch phosphorylase 或  $\alpha$ -amylase 表現位置均與澱粉粒分布及細胞分化之位置有密切相關, 由上述結果推測澱粉代謝與水稻癒合組織再生植株有關, 甚值得進一步探討。

關鍵字: 水稻, 澱粉磷解酵素,  $\alpha$ -澱粉水解酵素, 植株再生, 免疫組織化學分析。

## The Regenerability of Rice Callus Is Closely Related to Starch Metabolism

Wen-Lii Huang<sup>1</sup>, Yu-Chie Wang<sup>2</sup>, Ping-Du Lee<sup>3</sup> and Li-Fei Liu<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Biotechnology, Fooyin University

<sup>2</sup> Department of Life Science, Taiwan Normal University

<sup>3</sup> Institute of Microbiology and Biochemistry, Taiwan University

<sup>4</sup> Department of Agronomy, Taiwan University

(Accepted for publication: December 12, 2005)

To determine the relationship between starch metabolism and shoot regeneration in rice (*Oryza sativa* L. cv. Ai-Nan-Tsao 39, ANT39) callus, the distribution of starch phosphorylase and  $\alpha$ -amylase in rice during callus induction and shoot regeneration were studied by immunohistochemical analysis. The results showed that highly regenerable callus, ANT39-Dry, possesses higher starch content at callus induction stage and higher glucose content at shoot regeneration stage than lower regenerable callus, ANT39-Wet. The higher starch content mainly caused from higher ADP glucose pyrophosphorylase activity. Besides, the higher glucose content at the initial regenerative stage possible resulted from medium and/or cellular starch and sucrose degradation. In addition, we found the localization of starch phosphorylase and  $\alpha$ -amylase were closely related to starch grains especially at the peripheral region of callus where is putative the regeneration site. It suggested that starch metabolism might play a critical role at callus induction and shoot regeneration.

**Key words:** *Oryza sativa*, Starch phosphorylase,  $\alpha$ -Amylase, Shoot regeneration, Immunohistochemistry.

### 前 言

植物細胞具分化全能性, 亦即細胞經適當的誘導, 可再生為一完整植株, 有許多報告指出此分化全能性與植物荷爾蒙、營養成分或逆境處理有關, 但有關再生機制為何目前仍未有

定論。吾人早期研究發現在水稻癒合組織誘導時有大量澱粉粒累積, 將此癒合組織移到分化培養基後澱粉粒消失, 一週內綠點形成, 之後綠點持續擴大, 導致芽體形成<sup>(1-3)</sup>。此種澱粉消長與植株再生有關的研究也曾在矮牽牛<sup>(4)</sup>、胡蘿蔔<sup>(5)</sup>、甘蔗<sup>(6)</sup>、及菸草<sup>(7)</sup>中發現。然而除菸草

\* Corresponding author. E-mail: lfliu@ntu.edu.tw

系統外，其餘並未進一步探討此澱粉消長原因。

此外，吾人也發現不同水稻品種誘導之癒合組織具有不同的植株再生能力，在所篩選的品種中，只有矮南早 39 (ANT39) 在癒合組織誘導時不需滲透壓逆境處理即可有超過 50% 植株再生率<sup>(8)</sup>。進一步研究發現將 ANT39 未成熟胚接種在 MSD<sub>10</sub> 培養基誘導癒合組織時，依其癒合組織外觀可區分為乾、濕兩類，將其分別移入分化培養基中，前者再生率顯著高於後者，這是一個極佳的培養系統用來探討澱粉代謝與水稻植株再生關係。

ADP glucose pyrophosphorylase (AGPase)、starch synthase 及 branching enzyme 被認為是高等植物體內澱粉生合成的關鍵酵素<sup>(9-11)</sup>，通常三者活性有類似的變化趨勢。而  $\alpha$ -amylase ( $\alpha$ -Amy) 與  $\beta$ -amylase 則為主要澱粉分解酵素，尤其是  $\alpha$ -Amy<sup>(12,13)</sup>。此外，starch phosphorylase (SPase) 在澱粉代謝中的角色，至今仍是個具爭議性的問題，已知 SPase 可催化一可逆反應<sup>(14)</sup>；到目前為止只有 SPase 能催化不需引子 (primer) 即可合成澱粉的反應<sup>(14-16)</sup>。但也有學者認為目前在植物體中尚未有報告指出 SPase 活性和澱粉合成有絕對關係<sup>(17)</sup>，他們認為 SPase 可能和澱粉分解較有關。上述澱粉代謝相關酵素之研究主要均以完整植物體為材料，惟在水稻癒合組織誘導與植株再生過程中，澱粉代謝相關酵素之表現與角色仍不清楚。

因此，本研究利用 ANT39 兩類不同形態的癒合組織為材料，首先分析水稻癒合組織誘導與植株再生過程中碳水化合物含量與 AGPase、SPase 及  $\alpha$ -Amy 酵素活性變化，並進一步利用酵素免疫定位分析觀察 SPase 與  $\alpha$ -Amy 表現，以釐清澱粉代謝相關酵素在水稻植株再生過程中扮演的角色。

## 材料與方法

### 一、癒合組織誘導與植株再生

本試驗以水稻矮南早 39 (*Oryza sativa* L. cv. Ai-Nan-Tsao 39, ANT39) 開花後 10-12 天未成熟胚為材料，利用 1% 次氯酸鈉消毒後接種在含 10  $\mu$ M 2,4-D MS 培養基<sup>(18)</sup> (MSD<sub>10</sub>) 中，於 26-28 °C 連續光照下誘導癒合組織形成，依其外表形態可區分為乾、濕兩類，分別以 ANT39-Dry、ANT39-Wet 表示，並於第 10、14、21、28 天分別取樣秤重。此外，將誘導 14 天後兩類不同癒合組織移除胚

芽後分別接種於 MSK<sub>20</sub>N<sub>10</sub> 培養基 (MS 基礎培養基另加入 20  $\mu$ M Kinetin 與 10  $\mu$ M NAA) 中，誘導植株再生，並於培養後第 1、3、5、7、9、11、13 天分別取樣固定，供各項分析用。由於不同培養階段癒合組織型態不一，取樣時均是收取該培養天數相近型態的組織，植株再生階段亦收取含再生部位癒合組織。部分持續培養至四週後，調查植株再生率。鮮重及水分含量測定方法參考 Huang 與 Liu<sup>(2)</sup>，每試驗至少重複三次。

### 二、碳水化合物含量測定

為了解水稻癒合組織誘導與植株再生過程中澱粉之代謝，本研究首先測定兩階段細胞內蔗糖、葡萄糖與澱粉含量。將取樣之癒合組織以冷凍乾燥法脫水後，利用 80% 熟酒精萃取兩次細胞內可溶性糖，離心後收集上清液，利用葡萄糖氧化酵素-過氧化酵素偶合反應 (glucose oxidase - peroxidase coupled reaction) 方法測定蔗糖與葡萄糖含量，而離心後的沈澱物，經清洗、糊化後，利用 amyloglucosidase (Sigma, A7255) 於 37 °C 下水解 40 小時，再測定葡萄糖生成量<sup>(2)</sup>。兩者測定均以葡萄糖溶液為標準。

### 三、蛋白質抽取與酵素活性測定

本研究分析 AGPase、SPase、與  $\alpha$ -Amy 等三個與澱粉代謝相關酵素活性，蛋白質抽取與活性測定主要參考 Chang<sup>(19)</sup> 方法。其中 AGPase 與 SPase 活性單位以每分鐘 Pi 生成量表示之，而  $\alpha$ -Amy 則是以每分鐘 maltose 生成量表示之。本試驗利用 Coomassie blue dye-binding 方法進行蛋白質定量，並以小牛血清蛋白為標準<sup>(20)</sup>。

### 四、酵素免疫組織定位分析 (Immunohistochemical analysis)

將收集的 ANT39-Dry 癒合組織以固定液 (4% paraformaldehyde, 1% glutaraldehyde, 0.8% NaCl, 10 mM phosphate buffer, pH 7.2) 室溫下固定至少 12 小時，再利用一系列 *t*-butanol 與 ethanol 溶液進行脫水，經滲蠟、包埋後，進行組織切片<sup>(21,22)</sup>。後續脫蠟、抗體反應與呈色主要參考 Wang 等人<sup>(22)</sup> 方法經部分修飾而來。經酵素免疫分析反應後的切片進一步利用 periodic acid 和 Schiff's reagent 進行染色，以利澱粉顆粒觀察<sup>(23)</sup>，本研究針對 SPase 與  $\alpha$ -Amy 兩種酵素進行

組織定位分析。

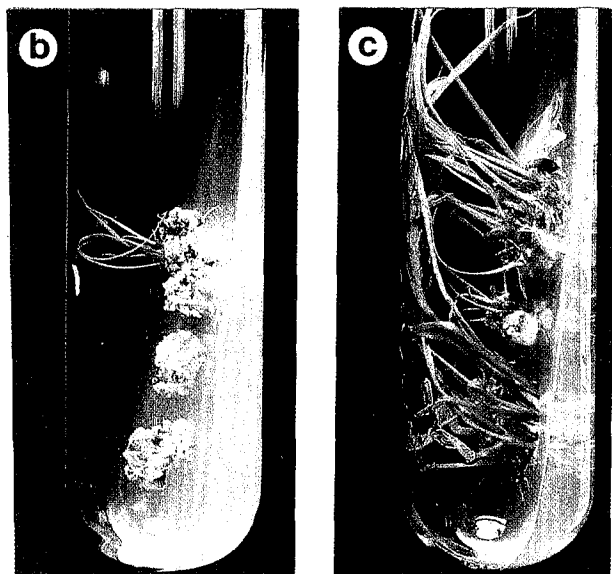
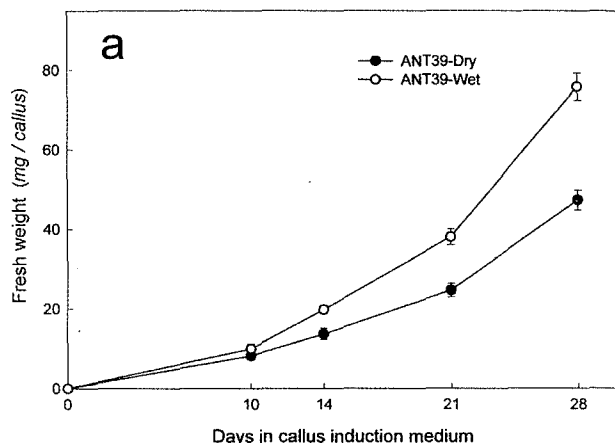
## 結果與討論

### 一、癒合組織生長與植株再生

ANT39 未成熟胚接種在 MSD<sub>10</sub> 培養基中誘導的癒合組織，由外觀上可明顯區分為乾、濕兩種(分別以 ANT39-Dry、ANT39-Wet 表示之)，其水分含量分別為 75%與 80%左右，前者也有較低細胞內水分潛勢與滲透潛勢(資料未列)；此外，ANT39-Dry 癒合組織外觀顏色較白、構造緊密，生長明顯比 ANT39-Wet 慢，且隨培養時間增長差異愈明顯(圖一 a)。將兩週齡的癒合組織分別移到分化培養基約 3 天後開始有綠點形成，第 10 天左右芽體逐漸形成。而在植株再生階段，ANT39-Dry 與 ANT39-Wet 兩者水分含量均隨培養天數增加而逐漸提高，分化後期便沒有明顯差異。四週後調查植株再生率，ANT39-Dry 可達 90%以上(圖一 c)，而 ANT39-Wet 分化率約只有 40%左右(圖一 b)，此結果顯示水稻癒合組織誘導階段細胞內水分狀態與植株再生有密切負相關，亦即癒合組織中低水分含量有助於後期植株再生，此與吾人利用滲透壓逆境處理降低細胞水分含量促進水稻植株再生之結果相同<sup>(1,2)</sup>，在其他作物培養系統中也有類似結果<sup>(24-26)</sup>。此結果也顯示 ANT39 誘導產生兩類不同癒合組織之培養系統極適合用來探討澱粉代謝與植株再生關係。

### 二、碳水化合物含量變化

本研究分析 ANT39 兩種癒合組織植株再生過程中蔗糖、葡萄糖與澱粉含量變化，結果發現 ANT39-Dry 在癒合組織誘導階段有較高的葡萄糖與澱粉含量(圖二 b, c)，將兩週齡癒合組織移至分化培養基後 5 天內，葡萄糖含量顯著增加(圖二 e)，而蔗糖與澱粉含量則隨培養天數增加逐漸降低(圖二 d, f)；而低植株再生能力的 ANT39-Wet 蔗糖與澱粉含量雖也有類似變化，但分化初期葡萄糖含量並無明顯增加趨勢(圖二 e)，此結果也符合吾人宣稱癒合組織誘導階段高澱粉含量與分化初期高葡萄糖含量為兩個水稻癒合組織再生與否重要指標之推論<sup>(1,2)</sup>。澱粉消長與植株再生有關，也曾在秋海棠<sup>(4)</sup>、甘蔗<sup>(5)</sup>、與菸草<sup>(6,24,26)</sup>中發現，惟分化初期高葡萄糖含量則只有在水稻培養系統中被報導。癒合組織誘導階段高量可溶性糖與澱粉累積，主要



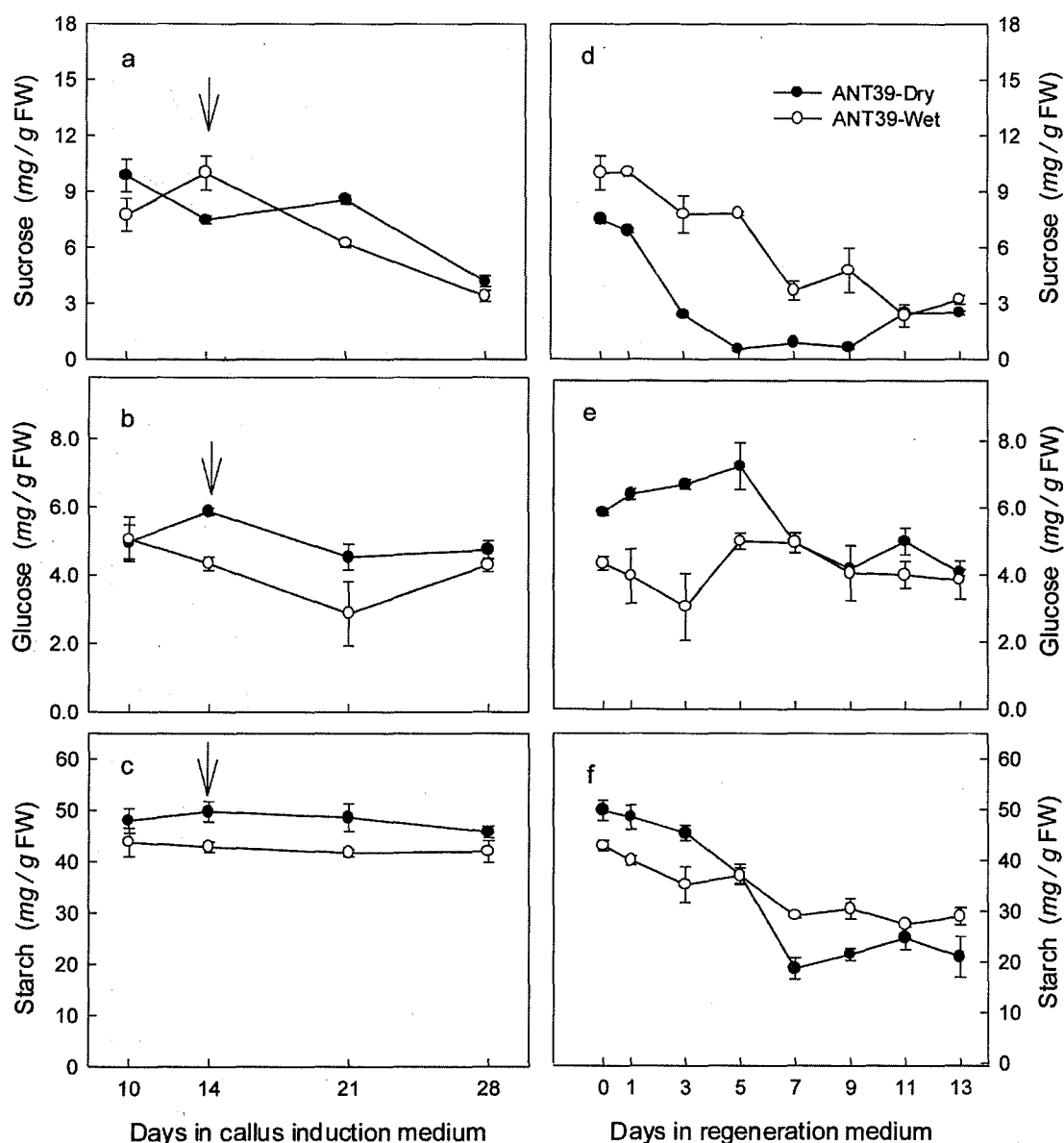
圖一 水稻癒合組織鮮重變化與植株再生情形

Fig. 1. Fresh weight and regeneration in rice callus. a, two kinds of rice callus, ANT39-Wet and ANT39-Dry, induced from MSD<sub>10</sub> medium. b and c showed the fourteenth-day callus described above was transferred to MSK<sub>20</sub>N<sub>10</sub> regeneration medium for 28 days, respectively. Vertical bars represent standard errors (n = 3). Only those standard bars larger than the symbol are shown.

是提供植株再生階段能量消耗所需<sup>(4,25,26)</sup>。

### 三、澱粉代謝相關酵素活性分析

由於 ANT39-Dry 與 ANT39-Wet 兩種癒合組織在培養過程中，蛋白質含量沒有顯著差異，但前者在癒合組織誘導階段水分含量明顯低於後者(資料未示)，為避免所分析的酵素活性差異可能是因為樣品鮮重差異所造成，因此，本試驗酵素活性以 specific activity 表示之。結果顯示在癒合組織誘導階段，具高分化能力的 ANT39-Dry 有較高 AGPase、SPase 與  $\alpha$ -Amy 活性



圖二 水稻癒合組織誘導與植株再生階段蔗糖、葡萄糖與澱粉含量變化  
 Fig. 2. Changes of sucrose, glucose, and starch contents in rice at callus induction (a, b, c) and shoot regeneration stages (d, e, f). The arrows in figure a, b, c indicated the timing of callus transferred to MSK<sub>20</sub>N<sub>10</sub> regeneration medium. Vertical bars represent standard errors (n = 3). Only those standard bars larger than the symbol are shown.

(圖三 a, b, c)，此結果顯示 ANT39-Dry 癒合組織內同時具高澱粉合成與分解能力，由於此階段具高澱粉含量，推測主要是因為澱粉合成增加所致；在菸草<sup>(27)</sup>及胡蘿蔔<sup>(25)</sup>系統中也有類似報導。但此結果與水稻另一再生系統利用滲透壓處理降低澱粉分解能力，導致澱粉含量增加而誘導植株再生之機制不同<sup>(1,2)</sup>，兩系統之差異值得進一步探討。

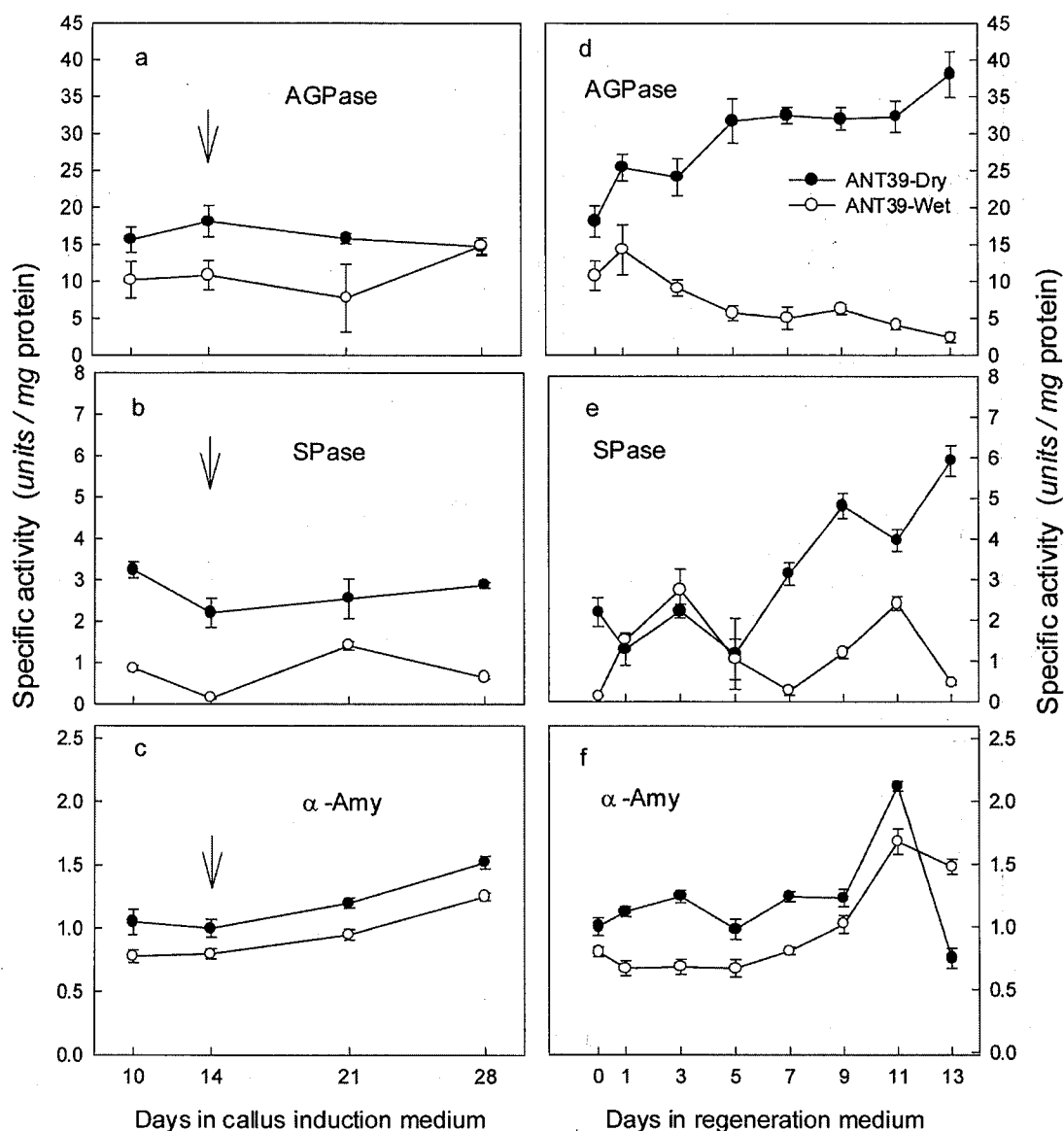
在植株再生階段，ANT39-Dry 細胞內 AGPase 與  $\alpha$ -Amy 酵素活性普遍有高於 ANT39-Wet 的趨勢(圖三 d, f)，顯示高分化能力的癒合組織仍具有較高澱粉代謝能力。另外，雖然 AGPase 活性

持續增加，但澱粉含量分析卻有逐漸下降趨勢(圖二 f)，推測部分原因可能是分化後期澱粉分解酵素活性高於澱粉合成活性，此外也可能是因為分化後期在新形成的特定部位有澱粉重新累積情形，造成局部澱粉合成活性增加現象(後續討論)。

#### 四、免疫組織定位分析

初步結果顯示酵素在 ANT39-Dry 與 ANT39-Wet 兩類癒合組織之定位分析並無明顯差異，惟在前者有較明顯表現，因此本研究均以





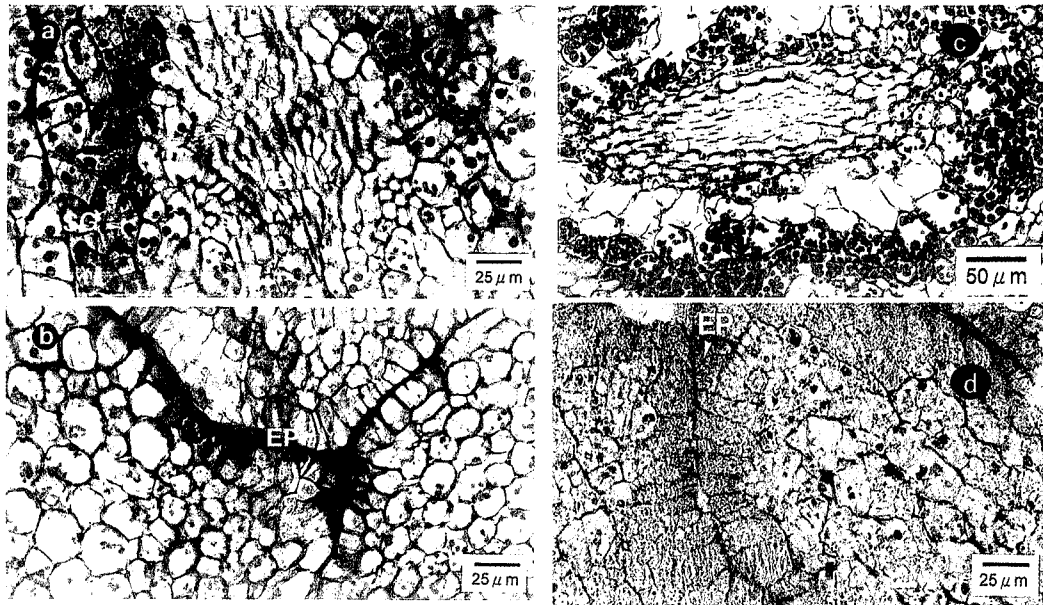
圖三 水稻癒合組織誘導與植株再生階段 AGPase、SPase 與  $\alpha$ -Amy 酵素活性變化

Fig. 3. Specific activity of AGPase, SPase, and  $\alpha$ -Amy in rice at callus induction (a, b, c) and shoot regeneration (d, e, f) stages. One unit of AGPase and SPase activity represent the amount of enzyme that catalyzes the formation of 1  $\mu$ mole Pi per min under the assay condition. One unit of  $\alpha$ -Amy activity represents the amount of enzyme that catalyzes the formation of 1  $\mu$ mole maltose per min under the assay condition. The arrows in figure a, b, c indicated the timing of callus transferred to MSK<sub>20</sub>N<sub>10</sub> regeneration medium. Vertical bars represent standard errors (n = 3). Only those standard bars larger than the symbol are shown.

ANT39-Dry 為材料進行組織切片分析。首先由組織切片分析發現，在癒合組織誘導時有大量澱粉粒累積(圖五 a、b)，由組織切片上也發現，在 ANT39-Dry 癒合組織誘導階段亦開始會有細胞分化現象，如圖五 b 顯示有管胞分子(tracheary elements, TEs)形成，TEs 被認為是根分化的前身<sup>(1,26,27)</sup>，此分化現象在低分化能力的 ANT39-Wet 及水稻台南 5 號培養系統中均未出現(資料未示)，此現象符合吾人早期的推論，認為在癒合組織誘導階段的細胞狀態對水稻培養細胞後續之植株再生能力有重要影響<sup>(1,2)</sup>。

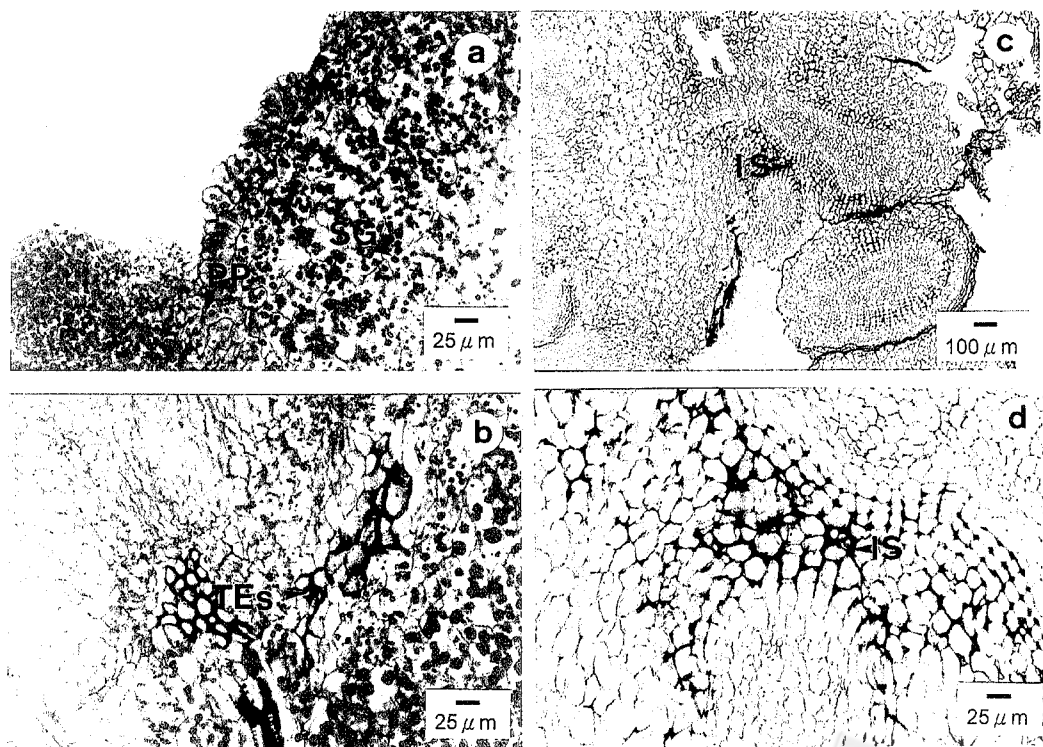
而這些在癒合組織階段累積的澱粉粒在植株再生階段，澱粉粒有減少的現象(圖四 b、圖五 c)，可能是提供植株再生所需能量。而在芽體形成後，吾人發現在部分新形成的根部中會有大量澱粉粒重新累積(圖四 c)，推測可能與提供芽體後續發育有關，此現象亦可能是上述 AGPase 澱粉合成相關酵素活性增加的結果。據吾人認知，此澱粉重新累積在再生植株根部的現象是首度被報導，值得進一步深入研究。

本研究進一步針對 SPase 與  $\alpha$ -Amy 兩酵素進行免疫組織定位分析，結果發現在癒合組織



圖四 水稻 ANT39-Dry 癒合組織植株再生過程中 SPase 組織定位分析

Fig. 4. Immunolocalization of starch phosphorylase in ANT39 callus on shoot regeneration medium. The sections were immunodetected by anti-SPase polyclonal antisera (a,b,c) and further stained for starch by periodic acid and Schiff's reagent. The control (d) was stained the same as above except without anti-SPase antisera hybridization. a, b, c, d, represented ANT39-Dry callus transferred to regeneration medium for 1, 9, 13, and 9 days, respectively. The positive staining represent blue and the background is pinky. Bars indicate the size on each panel. EP, epidermis; SG, starch granules; VB, vascular bundle.



圖五 水稻 ANT39-Dry 癒合組織誘導與植株再生過程中  $\alpha$ -amylase 組織定位分析

Fig. 5. Immunolocalization of  $\alpha$ -amylase in ANT39 during callus induction (a,b) and shoot regeneration (c,d) stage. The sections were immunodetected by anti- $\alpha$ -Amy polyclonal antisera and further stained for starch by periodic acid and Schiff's reagent. a, b represented ANT39 immature embryos inoculated on MSD<sub>10</sub> medium for 14 days. c, d represented ANT39-Dry callus transferred to regeneration medium for 5 days. The positive staining represent blue and the background is pinky. Bars indicate the size on each panel. IS, intercellular space; PP, peripheral cells; SG, starch granules; TEs, tracheary elements.

誘導階段幾乎很難偵測到 SPase 表現(資料未列)，將其移到分化培養基後發現，SPase 存在之處，亦有澱粉粒累積(圖四 a)，隨著培養天數增加，SPase 也有分布在部分特化組織表皮層的情形(圖四 b)，而在新形成的根部中所累積的澱粉粒附近並沒有 SPase 之呈色(圖四 c)，顯示 SPase 與澱粉分布及器官分化有一定相關性，惟本系統中 SPase 可能較傾向於澱粉分解角色，以致無法在新形成澱粉粒旁偵測到 SPase 表現，仍需進一步分析。Chang 與 Su<sup>(28)</sup> 曾發現在甘藷中 SPase 分布與澱粉代謝有關。

另外，結果也顯示水稻癒合組織誘導時累積的澱粉粒周圍有明顯  $\alpha$ -Amy 抗體呈色反應，尤其是在靠癒合組織外側部位(圖五 a)，此部位被認為是後續器官形成的主要部位<sup>(21)</sup>。此外， $\alpha$ -Amy 亦會出現在癒合組織階段即形成之 TEs 上(圖五 b)。而在植株再生階段， $\alpha$ -Amy 有逐漸往癒合組織內部擴散趨勢，到分化後期  $\alpha$ -Amy 分布更廣，會擴散至癒合組織內層細胞內與再生根部之細胞間隙(intercellular space, IS)附近(圖五 c、d)。上述結果顯示  $\alpha$ -Amy 可能與澱粉粒分布位置及器官形成有密切相關，主要原因可能是  $\alpha$ -Amy 可將澱粉分解，提供器官形成與後續發育所需能量，在菸草系統中也曾指出  $\alpha$ -Amy 與細胞分化有關<sup>(27)</sup>。

## 結 論

本研究利用水稻 ANT39 未成熟胚誘導產生外觀乾、濕兩種不同型態的癒合組織為材料，發現外觀較白、較乾的癒合組織植株再生能力顯著高於顏色較黃、水分較多者，顯示水分含量較低之水稻癒合組織較有利於後續植株再生。進一步進行碳水化合物含量與澱粉代謝相關酵素分析，結果顯示具高分化能力的 ANT39-Dry 癒合組織誘導時細胞內有較高的澱粉含量(圖二 c)，此高澱粉累積量主要可能是因為有較高澱粉合成酵素之活性所致(圖三)，與水稻另一再生系統利用滲透壓誘導降低澱粉分解導致澱粉累積促進植株再生之機制不同<sup>(1,2)</sup>。

而在植株再生階段初期，具高分化能力的 ANT39-Dry 細胞內有較高的葡萄糖含量(圖二 e)，此現象符合吾人早期的試驗結果，即分化初期高量葡萄糖可作為水稻癒合組織是否具有植株再生能力之重要指標<sup>(1,2)</sup>。而此高量葡萄糖，部份由細胞內蔗糖與澱粉分解而來(圖二)，一部份則可能由培養基中蔗糖分解而來<sup>(2)</sup>。由 SPase 與  $\alpha$ -Amy 等酵素定位分析發現其分布與澱粉粒及器官形成有關(圖四、圖五)，

上述結果顯示水稻癒合組織內澱粉代謝可能與植株再生能力有密切相關。

此外，本研究發現在部分新形成的根部會有大量澱粉粒重新累積(圖四 c)，在其他培養系統中均無此類似報導，推測可能與根的向地性及後續生長發育有關，惟其扮演的角色尚需進一步探討。

## 致 謝

本試驗承蒙行政院國家科學委員會與農業委員會計畫經費補助，特致謝忱。

## 參 考 文 獻

- (1) W. L. Huang and L. F. Liu: Promotion of shoot regeneration from rice (*Oryza sativa* L.) callus induced on the medium containing high concentration of sucrose. *Chinese Agron. J.*, **8**: 91-100 (1998).
- (2) W. L. Huang and L. F. Liu: Carbohydrate metabolism in rice during callus induction and shoot regeneration induced by osmotic stress. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, **43**: 107-113 (2002).
- (3) L. F. Liu and C. H. Lee: Changes of endogenous phytohormones during plant regeneration from rice callus. In: *Rice Genetics III. Proceeding of the Third International Rice Genetics Symposium* (G. S. Khush ed.), pp. 525-531. International Rice Research Institute, Philippines (1996).
- (4) B. S. Mangat, M. K. Pelekis and A. K. Cassells: Changes in the starch content during organogenesis in *in vitro* cultured *Begonia rex* stem explants. *Physiol. Plant.*, **79**: 267-274 (1990).
- (5) E. S. Wurtele, G. L. Keller, B. J. Nikolau and T. H. Ulrich: Quantitation of starch and ADP-glucose pyrophosphorylase in non-embryogenic cell and embryogenic cell cultures from carrot suspension cultures. *J. Plant Physiol.*, **132**: 683-689 (1988).
- (6) W. J. Ho and I. K. Vasil: Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.): Growth and plant regeneration from embryogenic cell suspension cultures. *Ann. Bot.*, **51**: 719-726 (1983).
- (7) T. A. Thorpe and T. Murashige: Starch accumulation in shoot-forming tobacco callus cultures. *Science*, **160**: 421-422 (1968).
- (8) W. L. Huang, Y. C. Tsung and L. F. Liu: Osmotic stress promotes shoot regeneration in immature embryo-derived callus in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Agri. Assoc. China.*, **3**(1): 76-86 (2002).
- (9) J. Preiss: Regulation of the biosynthesis and degradation of starch. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **54**: 431-454 (1982).
- (10) J. Preiss: Starch biosynthesis and its regulation. In: *Oxford surveys of plant molecular and cell biology* (J. Milin ed.), pp. 59-114. Oxford University Press, Oxford, UK (1991).
- (11) J. S. Hawker and G. M. Smith: Salt tolerance and regulation of enzymes of starch synthesis in cassava (*Manihot esculenta*). *Aust. J. Plant Physiol.*, **9**: 509-518 (1982).
- (12) J. C. Roger: Conserved amino acid sequence domain in  $\alpha$ -amylase from plants, mammals, and bacterial.



- Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1289**: 470-476 (1985).
- (13) M. Steup: Starch degradation. In: *The biochemistry of plants* (J. Preiss ed.), Vol. 14, Carbohydrates, pp. 255-296. Academic Press, New York, USA (1988).
- (14) M. N. Sivak, J. S. Tandecarz and C. E. Cardini: Studies on potato tuber phosphorylase-catalyzed reaction in the absence of an exogenous acceptor. I. Characterization and properties of the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.*, **212**: 525-536 (1981).
- (15) C. Y. Tsai and O. E. Nelson: Phosphorylase I and II of maize endosperm. *Plant Physiol.*, **43**: 103-112 (1968).
- (16) E. Slabnik and R. B. Frydman: A phosphorylase involved in starch biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **38**: 709-714 (1970).
- (17) J. Preiss and M. W. Sivak: Starch synthesis in sinks and sources. In: *Photoassimilate distribution in plants and crops, source-sink relationships* (E. Zamski and A. A. Schaffer eds.), pp. 63-96. Marcel Dekker Inc. New York, USA (1996).
- (18) T. Murashige and F. Skoog: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, **15**: 473-479 (1962).
- (19) A. T. Chang: *Influence of osmotic stress on starch content and starch metabolizing enzymes in sweet potato callus culture*. Master Thesis. National Taiwan University, Taipei, Taiwan (1995).
- (20) M. M. Bradford: A rapid and sensitive method for the determination of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 248-254 (1976).
- (21) W. L. Huang: *Studies on carbohydrate metabolism in rice (Oryza sativa L.) callus during shoot regeneration induced by osmotic stress*. Doctoral Dissertation. National Taiwan University, Taipei, Taiwan (1998).
- (22) A. Y. Wang, M. H. Kao, W. H. Yang, Y. Sayion, L. F. Liu, P. D. Lee and J. C. Su: Differentially and developmentally regulated expression of three rice sucrose synthase genes. *Plant Cell Physiol.*, **40**(8): 800-807 (1999).
- (23) R. L. Willey: *Microtechniques: a Laboratory Guide*. pp. 43-44. Macmillan publishers, New York, USA (1971).
- (24) D. C. W. Brown and T. A. Thorpe: Changes in water potential and its components during shoot formation in tobacco callus. *Physiol. Plant.*, **49**: 83-87 (1980).
- (25) D. F. Wetherell: Enhanced adventive embryogenesis resulting from plasmolysis of cultured wild carrot cells. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, **3**: 221-227 (1984).
- (26) T. A. Thorpe, R. W. Joy and D. W. M. Leung: Starch turnover in shoot-forming tobacco callus. *Physiol. Plant.*, **66**: 58-62 (1986).
- (27) T. A. Thorpe and D. D. Meier: Starch metabolism in shoot-forming tobacco callus. *J. Exp. Bot.*, **25**: 288-294 (1974).
- (28) T. C. Chang and J. C. Su: Starch phosphorylase inhibitor from sweet potato. *Plant Physiol.*, **80**: 534-538 (1986).

