

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

水稻胚乳相關突變體的篩選及其定性(1/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2313-B-002-064-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：國立臺灣大學農藝學系暨研究所

計畫主持人：謝兆樞

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94年5月16日

行政院國家科學委員會專題研究計畫進度報告

水稻胚乳相關突變體的篩選極其定性(1/3)

Screening and characterization of rice endosperm related mutants (1/3)

計畫編號：NSC 93-2313-B-002-064

執行期限：自民國 93 年 8 月 1 日起至民國 94 年 7 月 31 日

主持人：謝兆樞 執行機構及單位：國立台灣大學農藝學系

一、中英文摘要

關鍵詞：水稻、黃色胚乳。

在後基因體時代，研究突變體在了解各基因的功能上扮演著及其重要的角色。此其中，包括了誘導突變、研究突變性狀、鈎取目的基因以及分析特定的基因等。水稻定序草圖已初步完成，它帶動了活絡的功能性研究，在臺灣就已經有一些研究單位利用 T-DNA tagging、*Ac/Ds* tagging 及 sodium azide 等技術發展出三個水稻的突變體族群。從這些族群我們能夠篩選許多跟種實性狀相關的突變體，在本三年的計劃中，我們將對這些材料進行分析與利用。

在未來的三年內、我們擬著重在下列三種跟胚乳相關的性狀：糯性及半糯性、有色胚乳及香氣。由於這些突變性狀都在日本型品種所誘導，我們也將進一步將這些突變體和印度型材料進行雜交，產生 F₂ 分離族群用於遺傳研究及定點選殖的工作。

第一年我們已從 T-DNA tagging sodium 及 azide-induced 族群篩選黃色胚乳得突變體；同時也獲得碳化古米樣品可一起進行相關的比對研究。

Abstract

At the post-genomics era, studies on the mutants play a central role to understand the function of each genes. This includes inducing mutants, study on mutated traits, pull out target gene through forward or reverse genetics, and perform the analysis for that specific gene. The rice genome sequencing draft was released recently by the international consortium and two private sectors. Here in Taiwan, several groups have been generating rice mutants through T-DNA tagging, *Ac/Ds* tagging and sodium azide treatment recently. From those populations, we are able to screen several mutants on grain composition. They would be used as the material for the present project.

In the next three years, we will emphasize on the following three mutant characteristics: waxy (and so-called semi-waxy) rice, colored rice, and fragrant rice. We will also cross

these mutants with indica rice for the generation of F₂ segregating population. They will then be used for the material of genetic analysis and positional cloning.

In the first year, we have obtained several color endosperm mutants from T-DNA tagging sodium azide-induced mutated populations. And we also have many ancient rice samples supported by archaeologists of Academia Sinica, which would be used in comparative investigation with our mutants.

Keywords: Yellow endosperm, Rice (*Oryza sativa*).

二、緣由與目的

植物儲存器官中澱粉的合成是循序被包裝成澱粉顆粒 (starch granule)。當胚乳成熟乾燥時，會導致粉質體膜的破壞，澱粉顆粒就會和胚乳的蛋白基質 (protein matrix) 接觸在一起。從成熟的種實分離的澱粉顆粒含有兩種蛋白質：一種是當澱粉儲進粉質體時一起被包裹進澱粉顆粒層狀構造裡面者；另一種則是在成熟及澱粉顆粒長成過程與澱粉顆粒表面接觸在一起的表面蛋白 (Schofield and Greenwell, 1987)。目前這方面的研究在小麥有很好的結果 (Greenwell and Schofield, 1986)；例如小麥的表面蛋白有一種是分子量 15kD 所謂的顆粒表面結合蛋白 (granule-surface associated

protein)，已被證實與胚乳質地 (endosperm texture) 有關。這個 15kD 的蛋白在發育中的種實是位於液泡 (vacuole) 現已正名為 puroindolines (Gautier *et al.*, 1994)。十年來，puroindolines 在小麥與大麥種實胚乳質地的決定因素有了更深入的研究，它的基因也已經被選殖出來 (Darlington *et al.*, 2001)。至於真正和澱粉顆粒成長有關的蛋白則多為澱粉生合成的酵素，主宰著澱粉的理化性質；在玉米、大麥、小麥、水稻、高粱及豆類都有相當廣泛的研究 (Shure *et al.*, 1983; Preiss, 1991; Nakamura *et al.*, 1993a, 1993b; Sano, 1984; Hsieh, 1988; Sivak *et al.*, 1993)。此其中，研究最多的是 59-60kD 的 GBSS (granule-bound starch synthase)，簡稱 waxy protein。在禾本科植物 GBSS 是控制在臘質基因座 (waxy locus) (Nelson and Rines, 1962; Tsai, 1974; Hsieh, 1988)，顯性對偶基因的產物就是 GBSS，主控粉質澱粉的合成。一般非糯性品種就屬於這種基因型，粉質澱粉與臘質澱粉比率約為 30:70，物種內與物種間有相當大的變異存在；在糯性品種其基因型為純接合隱性 *wxwx*，粉質澱粉與臘質澱粉比率接近於 0:100 (Sparague *et al.*, 1943; Hsieh, 1988)。另外也是被深入研究的有 Denyer *et al.*, (1993) 所報告豆類的 branching enzyme (114, 100kD) 及 starch synthase (59, 77kD)；Rahman *et al.*, (1995) 報告在小麥類似水稻 soluble starch synthase 的蛋

白 (75kD)、類似玉米 branching enzyme 的蛋白 (85kD) 以及本實驗室在高粱所發現 branching enzyme (Hsing *et al.*,2003) 以及在高粱等類在抗體交叉辨識試驗中無法確定 100kD、105kD 的蛋白。另外，在大麥糊粉層 (aleurone layer) 及子葉盤表皮細胞 (scutellar epithelium) 也有一些新合成的 proteinases 及 Cell wall degradation enzymes (notably β -glucanases) 也都和大麥在利用麥芽與釀造時胚乳的崩解有關 (Briggs, 1987,1992)。除了以上這些與澱粉結合在一起或特定部位新合成的種實的蛋白質成分之外，還有一些非蛋白質的種實成分也是在種實的利用上佔有很重要的地位，尤其是育成具有特殊用途、特殊區隔性的作物新品種，例如顏色〔色素〕與香氣等都是頗具開發潛力的性狀 (Shewry and Morell, 2001)。

近年來，由於雜糧作物的育種改良工作，隨著農業政策的改變而逐漸式微，水稻成為台灣農業最不能棄守的作物產業；水稻的研究幾已成為農學研究水平的指標。再者，這些年來植物基因組 (genome) 的研究在台灣已經逐漸展開，尤其是水稻方面的研究更是投下巨大的人力、物力，累積了大量的植物基因的資訊與數據，帶領了熱絡的功能性的研究。此其中，最具直接育種價值的當數大量突變體的誘導。這些水稻突變體族群除了日本的反轉錄跳躍子 *Tos 17* 插入突變所誘導者之外，台灣自己的研究單

位也有可以利用的族群。例如，農業試驗所及其分所的以 sodium azide 誘導突變的族群、中央研究院與農業試驗所合作的以 T-DNA knock-out 誘導的族群以及台灣大學農藝系的以 *Ac/Ds* 跳躍子系統插入突變所誘導的族群。這三個台灣自己誘導的族群所涵蓋的突變範圍極廣，所呈現的多樣性並不亞於日本的族群，這些珍貴的材料除了各單位用在功能基因體學的研究之外，也樂意提供給外界篩選可資利用的變異。本人的實驗室過去數年來在國科會的支持下已進行高粱、水稻種子胚乳的 GBSS, SSS, branching enzyme, debranching enzyme, ADPG pyrophosphorylase 等的 cDNA clones 選殖定序以及有關澱粉顆粒生成的 proteomics 分析，同時也有過高粱 EMS 誘導突變體分離的經驗；再者，本人承國科會第三十七屆補助科學與技術人員國外短期研究，於 1999 年 8 月至 2000 年 7 月赴英國蘇格蘭作物研究所 (Scottish Crop Research Institute, Dundee) 進修，所作的就是分離大麥胚乳突變體及其澱粉顆粒結合蛋白 (starch granule associated proteins) 的蛋白質體研究。返國後又繼續與中研院生化所陳水田博士實驗室合作用高粱及水稻澱粉結合蛋白進行相關的研究。

緣此，本計畫擬就上述三個台灣現有的族群進行與胚乳相關的突變體的分離與分析。我們研究的目標重點性狀包括澱粉特性 (以 amylose / amylopectin 為指標，包

括糯性與半糯性*)、有色胚乳 (colored endosperm; 以金黃色系列為主, 其他色系為輔) 以及香氣 (fragrance)。全程計畫擬分三年進行。在第一年, 我們開始篩選了 T-DNA tagging 族群中與胚乳性狀相關的突變體。同時我們得到中央研究院史語所南科考古隊提供的碳化古米樣品, 可以一起進行比對研究。

三、結果與討論

T-DNA tagging 及 sodium azide-induced 突變族群中黃色胚乳突變體的篩選

水稻黃色胚乳突變體的相關酵素已經被歸類的有：

- (1) *eranylgeranyl pyrophosphate synthetase*. EC 2.5.1.29 . full-length cDNA accession # [AK121529](#). digital Northern analysis indicates message present in leaf, panicle and callus. Two gene copies in rice genome, at chrom # 5 and 7.
- (2) *phytoene synthase*. EC 2.5.1.32. # AK070716. message present in leaf, stem, young seeds. 3 gene copies in rice genome, at chrom # 6, 9, 12.
- (3) *phytoene desaturase* EC: not available. Sequence not available
- (4) *zeta-carotene desaturase* EC:1.14.99.30 AK065213 message present in leaf One copy

in rice genome, chrom # 7

- (5) *lycopene beta cyclase* EC: not available. Sequence not available.

我們已從水稻野生型及突變體的 leaf, young panicle, glume of developing seeds, endosperm of developing seeds 萃取 RNA, 設計了引子進行 RT-PCR. 開始比對其基因的序列。

碳化古米樣品的初步觀察

由中研院史語所於南科出土牛稠子文化遺址挖掘到水稻炭化種子, 取得第一批約三千多年前牛稠子文化遺址出土的二十顆炭化稻穀, 其稻穀幾乎已無殘留。使用光學顯微鏡初步觀察穀粒外觀形狀大小, 無法分辨稻穀間的差異。利用水稻 *Japonica* 及 *Indica* 質體連鎖基因上 *rpl16* 與 *rpl14* 之間序列約 100bp 中, 有一片段具核苷酸 CA 重複作為 PS-ID (Plastid subtype identity)。 *Japonica* 具有 6C7A、7C6A 序列片段, *Indica* 具有 7C7A、8C8A、9C7A 序列片段。而且 63% *Indica* 葉綠體 DNA (cpDNAs) 在 Pst-12 片段 ORF-100 位置有缺失 69bp 序列, 但是所有 *Japonica* 葉綠體 DNA 在 Pst-12 片段 ORF-100 位置沒有缺失 69bp 序列。利用此兩種不同序列特徵可以作為區分依據。先抽取炭化穀粒及對照組的現生水稻品種 (含私稻與粳稻) 之質體 DNA, 設計引子, 使用聚合酵素連鎖反應 (PCR) 方法, 進行將 *rpl16* 和 *rpl14* 基因之間片段序列與放大, PCR 產物用 agarose gel 進行電泳, 結果現生水稻品種序列可以清楚看到條帶, 但是炭化穀稻沒有條帶產生, 再

跑第二次 PCR 結果也相同。再用 PCR 方法將 Pst-12 片段 ORF-100 區域放大，PCR 產物用 agarose gel 進行電泳，結果亦相同。猜測可能沒有抽到炭化穀稻之 DNA，但是之後再重新進行抽取 DNA，進行 PCR，電泳結果仍然只能看到現生水稻 DNA 的條帶。

第二批取得約五千年前牛網子文化遺址出土的九百八十顆炭化稻穀，重複使用 PCR 的方法，仍然沒有得到結果，猜測可能是殘留下來 DNA 含量很少或是已無遺留。使用光學顯微鏡觀察估計約有三分之一數量的穀粒仍有殘留稻殼。使用掃描式電子顯微鏡觀察部分仍有殘留稻殼之炭化稻穀，發現稻殼表面可以觀察到雙峰乳突，欲使用「水稻雙峰乳突鑑定法」進行判別，利用水稻雙峰乳突具有峰

(peak)、峽 (col)、凹 (depression)、谷 (valley) 和副突 (attached papilla) 等特徵，其可測量的數量性狀有雙峰距 (BPD)、峽深 (CD)、距/深比

(BPD/CD)、峰角度 (PA)、峽角度 (CA) 以及乳突縱距 (VD)、和基部橫寬 (HW) 等，再利用判別函數公式 $G(X) = 44.4788 - 0.4308(BPD) - 0.4263(PA) + 0.075(BPD/CD)$ 進行判別。 $G(X)$ 得正值為 A 型 (Acute type) 雙峰乳突，多數為秈稻品種屬之； $G(X)$ 得正值為 O 型 (Obtuse type) 雙峰乳突，多數為粳稻品種屬之。判別準確率可達 95.58%。同時以判別函數的後驗概率 (Posterior probability) 作雙峰乳突演化程度指標，可將兩種雙峰乳突類型分為混沌態 (I 型)、分化態 (II 型) 和穩定態 (III 型) 等三種演化狀態。但是所挑選出的稻穀之稻殼上雙峰乳突大部份磨損嚴重，效果

不盡理想，難以精確測量，仍需進一步觀察是否有完整的雙峰乳突可以利用。

測量具有較完整外形之 586 粒炭化稻穀，平均粒長 4.01mm、粒寬 2.12mm、粒厚 1.57mm。長寬比 1.90mm (變異係數 9.17%)，其粒型為短圓形。形狀變異幅度較大，粒長在 2.2mm—4.47mm 之間，粒寬在 1.45mm—2.65mm 之間，粒厚在 1.09mm—2.43mm 之間，長寬比在 1.18mm—2.62mm 之間。由穀粒形狀初步判別大部份可能為粳稻。

四、計畫成果自評

本計畫原定的進度都在正常進行，有中研院史語所的樣品更能讓本計劃的研究從不同世代的樣品觀察到更長時間的基因變化。

五、參考文獻

- Beyer, Peter, Salim Al-Babili, Xudong Ye, Paola Lucca, Patrick Schaub, Ralf Welsch and Ingo Potrykus . 2002. Golden rice: Introducing the β -carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency1. *J. Nutr.* 132: 506S–510S
- Cheng C, Motohashi R, Tsuchimoto S, Fukuta Y, Ohtsubo H, and Ohtsubo E. 2003. Polyphyletic origin of cultivated rice: based on the interspersed pattern of SINEs. *Mol Biol Evol* 20:67-75.

Chen, W-B., Nakamura,I., Sato,Y-I., and Nakai,N. 1994. Indica-Japonica differentiation in Chinese rice landraces. *Euphytica* 74: 195-201.

Ishikawa R, Nakamura I, Nishihara T, Kikuchi M, Senda M, Akada S, Harada T,and Niizeki M. 2002. Origin of cytoplasm substituted rice cultivars found in Japan. *Theor Appl Genet* 105:608-613.

Ishikawa R, Sato I, Tang T,and Nakamura I 2002. Different maternal origins of Japanese lowland and upland rice populations. *Theor Appl Genet* 104:976-980.

Ye, X., Al-Babili, S., Klo^oti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P. & Potrykus, I. (2000) Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287: 303–305.

河南省文物考古研究所：<舞陽賈湖>，科學出版社，1999年。