

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

水稻營養器官中澱粉代謝基因表現之研究(I)水稻葉鞘中澱粉代謝之調控機制(1/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2313-B-002-070-

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：王淑珍

計畫參與人員：王淑珍、陳懷如

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 30 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

水稻營養器官中澱粉代謝基因表現之研究(I)水稻葉鞘中澱粉代謝之調控 機制(1/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC 93 - 2313 - B - 002 - 070

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：王淑珍

計畫參與人：王淑珍、陳懷如

水稻營養器官中澱粉代謝基因表現之研究

水稻葉鞘中澱粉代謝之調控機制

摘要

水稻(*Oryza sativa L.*)葉鞘為一暫存性組織，其在抽穗前累積的澱粉，在抽穗之後會成為提供穀粒中碳水化合物的來源之一，此現象為水稻葉鞘 sink-source 性質轉換期間最明顯的特徵，並影響穀粒的產量。然而，控制葉鞘 sink-source 轉換時期澱粉合成及代謝之機制仍然不清楚。在我們的研究中，觀察到水稻劍葉下第二片葉片(-2 葉)的葉鞘會在抽穗前大量累積澱粉，抽穗之後澱粉含量迅速下降。為了了解水稻 -2 葉葉鞘澱粉在抽穗期前後含量變化的調控機制，我們利用 slot-blot reverse northern 分析的方法觀察中澱粉生合成、澱粉分解及其他醣類代謝相關酵素的基因表現。結果顯示，*ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit (AGPL)* and small subunit (*AGPS*), *granule-bound starch synthase I (GBSSI)*, *branching enzyme (BE) I, BE IV*, *soluble starch synthase (SSS) II-2, SSSIII, SSSIV-1, SSSIV-2* 在抽穗前會增強表現，抽穗之後表現量降低。而 *BEIII*, cytosolic 及質體內 *fructose-1, 6-bisphosphatase* 的表現量則是在抽穗時明顯達到最高峰。澱粉分解相關酵素 *-amylase* 和蔗糖代謝相關酵素 *sucrose phosphate synthase (SPS)*, *invertase* 及 *sucrose transporter (SUT)1, SUT2* 則是在抽穗之後提高表現量。結果顯示這些基因可能為影響澱粉含量在抽穗期前後變化之主要因子。藉此，我們將更進一步探討此些基因表現之調控機制，以了解水稻葉鞘 sink-source 轉換的調控機制。

Abstract

Starch accumulated in rice (*Oryza sativa L.*) leaf sheath before heading and degradation for providing carbon source to panicles after heading is an important factor to affect the grain yield. However, the mechanisms for controlling the starch synthesis and metabolism in leaf sheath at the sink-source transition stage are still unclear. In this study, starch content change during the heading period in the second leaf sheath (-2 leaf sheath) below flag leaf was observed. In order to understand the regulatory mechanism of starch content change during heading period, expressions of 18 genes involved in starch synthesis and

degradation were identified during this period. Besides, expressions of several genes related to nitrogen metabolism, sucrose biosynthesis and photosynthesis were also determined in -2 leaf sheath. Among carbohydrate metabolism-related genes, the reverse northern hybridization data showed that the mRNA level of *ADP-glucose pyrophosphorylase* large subunit (*AGPL*) and small subunit (*AGPS*), *granule-bound starch synthase I* (*GBI*), *branching enzyme* (*BE*) *IV*, *soluble starch synthase*(*SSS*) *II-2*, *SSSIII*, *SSSIV-1*, *SSSIV-2* were increased before heading and decreased after heading. The transcript accumulations of *BEIII*, cytosolic and plastidic form of *fructose-1, 6-bisphosphatase* were increased at the time of heading. The results were suggested these gene expressions could be related to the sink-source transition of -2 leaf sheath. On the other hand, *sucrose phosphate synthase* (*SPS*) gene expressions were more active after heading.

前言

水稻穀粒發育及充實過程中所需之碳水化合物來源有兩類，一類為抽穗前在莖稈中合成及累積之澱粉，其在抽穗後會分解成小分子碳水化合物並運送到穀粒中 (Perez, 1971);另一個來源是在抽穗後的時期，由葉部進行光合作用所合成之醣類直接提供穀粒充實時之所需。穀類作物的莖稈可以做為光合作用產物的暫時性儲存組織，水稻於抽穗前累積在莖稈的澱粉對穀粒最終產量有 30%的影響力 (Cock and Yoshida, 1972), 水稻莖稈中澱粉在抽穗前後含量變化之現象為 sink-source 組織性質轉換之特徵。葉鞘 sink-source 轉換機制的調控不同於發育中的葉片，關於水稻莖稈暫時性儲存組織在 sink-source 轉換過程調控機制，目前仍不了解。藉由了解水稻莖稈中澱粉在抽穗期前後之合成及分解機制，將有助於了解 sink-source 轉換之調控機制。

植物之澱粉是由直鏈澱粉 (amylose)及支鏈澱粉 (amylopectin)所組成，藉由在儲存性組織 (例如:胚乳)及光合組織 (例如:葉部)中之研究，已知澱粉生合成過程十分複雜。主要有三大類酵素參與澱粉合成過程: (1)ADP-glucose pyrophosphorylase (*AGPase*)，其是由兩個 large subunit (*AGPL*)及兩個 small subunit (*AGPS*)所構成。*AGPase* 主要負責將由蔗糖分解而得之 glucose-1-phosphate 與 ATP 反應後，形成 ADP-glucose，其為澱粉合成的主要之反應物。(2)starch synthase (*SS*)，這類酵素

可以依其所在的位置不同分成兩種，一類是會和澱粉粒緊密鍵結的 granule-bound starch synthase (GBSS)，另一種為 soluble starch synthase (SSS)。GBSS 及 SSS 會將 ADP-glucose 上的 glucose 分子以 α -1,4 鍵結合至 glucose 聚合鏈上，並分別負責直鏈澱粉 (amylose) 及支鏈澱粉 (amylopectin) 鏈的延長。(3) *branching enzyme* (BE)，主要負責澱粉支鏈的形成。BE 主要負責澱粉分子支鏈的形成。另一方面，已知在植物體中和澱粉分解相關的酵素有三大類：(1) α -amylase，其屬於 gene family 最龐大的一群，為一種 endoamylase，可以切斷 glucose 聚合分子的 α -1,4 鍵結；(2) β -amylase，屬於一種 exoamylase，其作用也是在打斷 glucose 聚合分子的 α -1,4 鍵結；(3) debranching enzyme (DE)，其負責水解 glucose 聚合分子 α -1,6 的鍵結。上述這些生合成途徑中所需之酵素大多有許多不同之 isoform，且其分別由不同之基因表現。同一 gene family 中之不同基因之表現可能具有發育時期及組織專一性。為了詳細了解澱粉含量變化在抽穗期間的調控，我們觀察了葉鞘中 27 個參與醣類代謝之基因在抽穗期間的表現，其中包含了澱粉合成、分解及蔗糖代謝相關之基因。藉由探討影響水稻葉鞘在抽穗時期的澱粉含量變化之主要控制基因及其調控因子，將有助於了解 sink-source 的轉換機制。

材料方法

植物材料及生長狀況

台農 67 號水稻 (*Oryza sativa* L. cv. *Tainung67*; TNG67) 種子，經過消毒後用木村氏水耕液培養至 3~4 葉齡時，移到面積為 30X60 公分的土盆中。材料於 2004 年 7 月 21 日播種，大約 90 天後抽穗，從抽穗前 20 天起開始採收材料，每隔 5~6 天採收一次，並持續收集至抽穗後 20 天。為測定澱粉含量變化及醣類代謝相關基因表現，採取之材料含劍葉、劍葉下第一葉 (-1 葉)、劍葉下第二葉 (-2 葉)及劍葉下第三葉 (-3 葉)，且葉身及葉鞘分別收集，

澱粉含量測定

採取鮮重 0.5 克的葉身或葉鞘樣品，於液態氮中用研鉢和杵研磨成粉末，使用 80%酒精於 80 ℃ 中萃取兩次。以 2000 g 的轉速離心 5 分鐘，去掉上清液。用二次水溶解沉澱物並在沸水中糊化兩小時後，取適量糊化澱粉液和 amyloglucosidase 及 pullulanase 酵素於 55 ℃ 作用一個半小時，之後測定其中葡萄糖的含量 (Bergmeyer and Bernt, 1974)。

Slot-blot reverse northern 分析

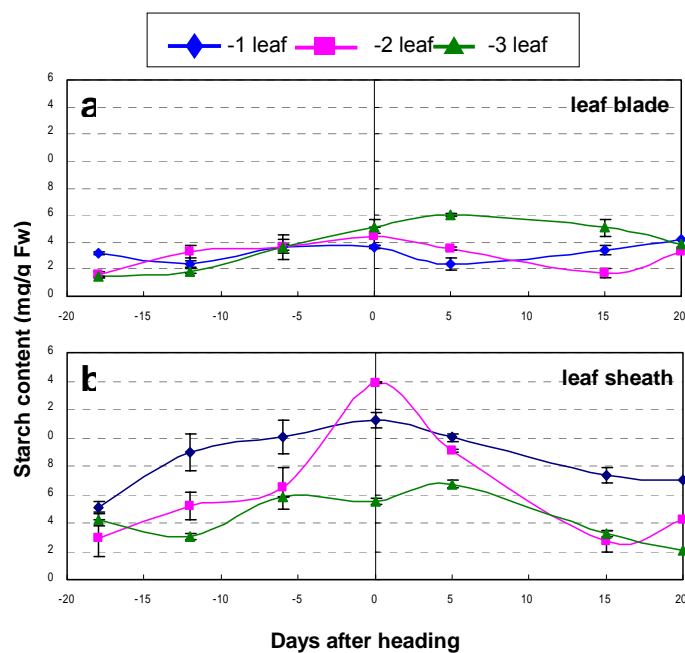
設計澱粉生合成、澱粉分解及蔗糖代謝相關基因的 PCR 專一性引子，利用 RT-PCR 合成出這些基因的部份 cDNA 片段。每個基因分別取 3 µg 以 slot blot 轉印在 nylon-membrane 上。另一方面，利用 Trizol reagent [Invitrogen, USA]萃取來自不同生長階段的水稻葉鞘 total RNA，取 50 µg RNA 加入下列試劑: 5 µl oligo(dT) (0.5µg/µl), 80 µl 5Xfirst strand buffer, 2.5 µl dNTP-mix (10 mM), 5 µl DTT(0.1M), 2.5 µl Superscript™ III RNaseH⁻ Reverse Transcriptase [Invitrogen, USA]，於 37 ℃ 作用一小時，合成第一股 cDNA。反應後再加入 7.5 µl dNTP-mix (10 mM), 50 µl 10XPCR buffer, 5 µl polymerase I, 1.75 µl RnaseH (2U/ µl) and 1.25 µl DNA ligase (30U/ µl) 於 16 ℃ 培養兩小時，合成雙股的 cDNA。雙股 cDNA 溶解於 EDTA 溶液中並煮沸 5

分鐘，使用 Rediprime II Random Prime Labelling System [Amersham, UK] 及 α -[32 P]-dCTP 進行標定。標定後之探針和 slot-blot nylon-membrane 於 65 進行雜合反應 4 小時，之後於 0.1 %SDS、0.1 XSSC 溶液中清洗兩次，並使用 Kodak X-ray film 進行顯影。

結果

水稻主稈中上位葉各葉身及葉鞘中的澱粉含量在抽穗期前後的變化

由前人的研究知道並非所有的水稻葉鞘都具有暫時性儲存組織之功能，因此我們利用澱粉含量變化當做指標，鑑別 TNG67 號水稻中，那一部份之葉鞘為主要的暫時性儲存組織。在所有採收的葉片中，其葉身的澱粉含量變化在抽穗期前後都沒有明顯的改變 (圖一 a)。而在葉鞘中，我們偵測到 -1 葉及 -3 葉葉鞘的澱粉在抽穗前會稍微上升，而在抽穗後稍微下降，其變化並不明顯。但是，在 -2 葉的葉鞘中，澱粉在抽穗前會大量累積，而在抽穗後迅速降解 (圖一 b)。劍葉葉身的澱粉含量在抽穗期前後也和其他葉之葉身一樣，沒有明顯變化，但劍葉葉鞘裡的澱粉含量則是由抽穗前 20 天至抽穗後 20 天，都呈現持續上升的趨勢，其澱粉含量也遠高於其他葉片葉鞘 (data not shown)。

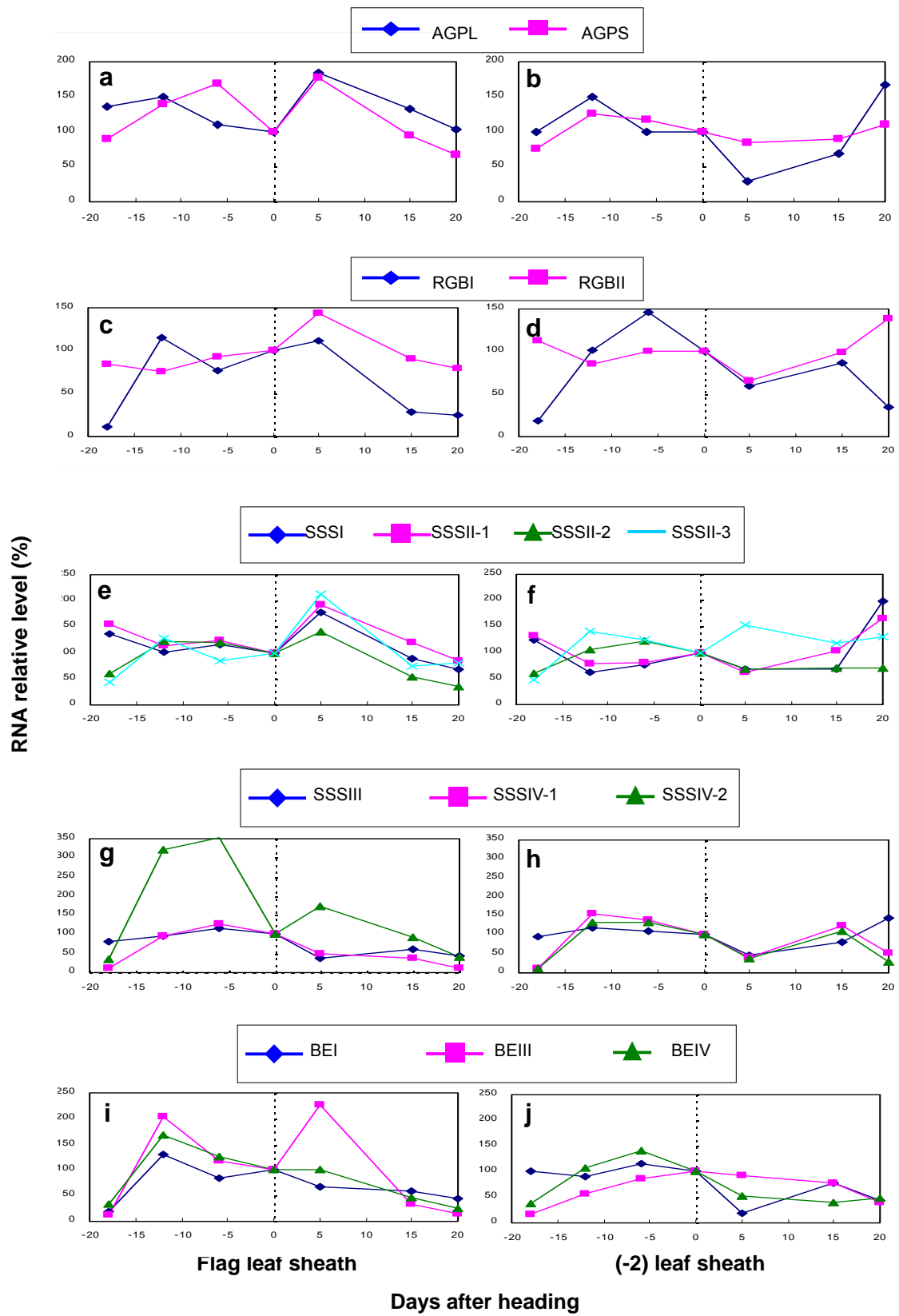


圖一. 水稻上位葉葉身(a)及葉鞘(b)在抽穗期間前後澱粉含量變化。

每個時間點之數據源自三株不同植株樣品之澱粉含量平均值。

澱粉合成相關基因在抽穗期間的表現

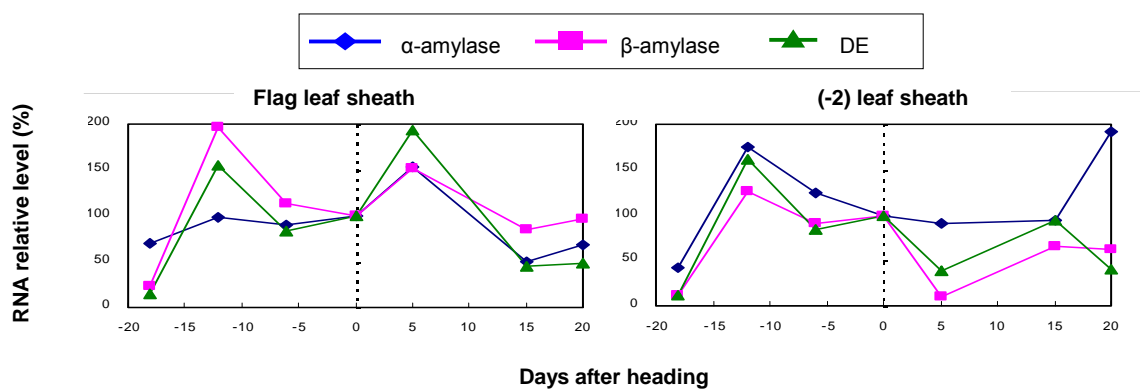
AGPase 是由兩個 large subunit 及兩個 small subunit 所組成，我們分別觀察表現兩種次單元酵素的基因 (*AGPL* 及 *AGPS*) 在抽穗期前後表現：在劍葉中，*AGPL* 的表現從抽穗前 20 天至抽穗時會稍微下降，之後會急遽上升，至抽穗後 5 天後又持續下降。*AGPS* 則是從抽穗前 20 天開始表現量上升，至抽穗前 5 天下降，抽穗後開始上升至 5 天後又下降 (圖二 a)。在 -2 葉中，*AGPL* 及 *AGPS* 的表現量都是在抽穗前微微上升，抽穗之後表現量下降，等到抽穗後 5 天表現量又有上升的趨勢 (圖二 b)。在水稻中已知 GBSS 酵素有 I 及 II 兩個 isoform，在劍葉中 *GBSSI* 的表現量從抽穗前 20 天開始上升至一個穩定的量，直到抽穗後 5 天急速下降，而 *GBSSII* 則是在抽穗前沒有明顯變化，抽穗後微微上升至抽穗後 5 天又下降(圖二 c)。在 -2 葉中 *GBSSI* 在抽穗前表現量會明顯上升，到抽穗前 5 天達到高峰，抽穗之後表現量下降，而 *GBSSII* 的表現則在抽穗期間沒有明顯改變(圖二 d)。目前為止在水稻中，soluble starch synthase (SSS)是具有最多 isoform 的澱粉合成酵素，其成員包含有 *SSS I*, *SSS II-1*, *SSS II-2*, *SSS II-3*, *SSS III*, *SSS IV-1* 及 *SSS IV-2*。在劍葉葉鞘中，*SSS I*, *II-1*, *II-2* 及 *II-3* 在抽穗前表現量變化不大，抽穗之後會稍微上升，等到抽穗後 5 天後又開始下降 (圖二 e)。劍葉中的 *SSS III*, *IV-1* 及 *IV-2* 在抽穗前的表現均會上升，等到抽穗之後表現量下降，尤其是 *SSS IV-2* 的變化更為顯著 (圖二 g)。在 -2 葉葉鞘中，*SSS II-2*, *III*, *IV-1* 及 *IV-2* 在抽穗前會提高表現，表現量在抽穗之後下降 (圖二 f, h)。水稻之 *BE* gene family 有 *BE I*, *III* 及 *IV* 三個成員，由基因表現的結果得知，*BE I* 及 *IV* 在劍葉中從抽穗前 20 天表現量會上升，在抽穗前 12 天達到高峰，之後便持續下降。而 *BE III* 在抽穗前 20 天也會提高表現量，但之後會下降至抽穗後才又提升表現量，等到抽穗後 5 天後持續下降 (圖二 i)。在 -2 葉葉鞘中，*BE* 的成員表現均很一致，都是在抽穗前大量表現，抽穗後表現量下降，尤其是 *BE III* 的表現形式和澱粉變化趨勢成高度正相關 (圖二 j)。



圖二. 劍葉葉鞘 (a,c,e,g) 及 -2 葉葉鞘 (b,d,f,h,i,j) 中擬刺白朊基因與刺基蛋白基因在抽穗期間的表現情形。

澱粉分解相關基因在抽穗期間的表現

我們觀察了三個澱粉分解相關的基因: α -amylase, β -amylase 及 *debranching enzyme (DE)* 在抽穗期前後的表現。在劍葉葉鞘中, β -amylase 及 *DE* 的表現情況相似, 在抽穗前 20 天會提升表現量, 5 天之後表現量降低直到抽穗後又上升, 至抽穗後 5 天又持續下降 (圖三 a)。 α -amylase 則是由抽穗前 20 天至抽穗後 5 天的表現都持續上升, 抽穗後 5 天才下降 (圖三 a)。在 -2 葉葉鞘裡, β -amylase 及 *DE* 均在抽穗前提高表現量, 抽穗之後表現量下降 (圖三 b)。而 α -amylase 抽穗之後表現量上升 (圖三 b)。

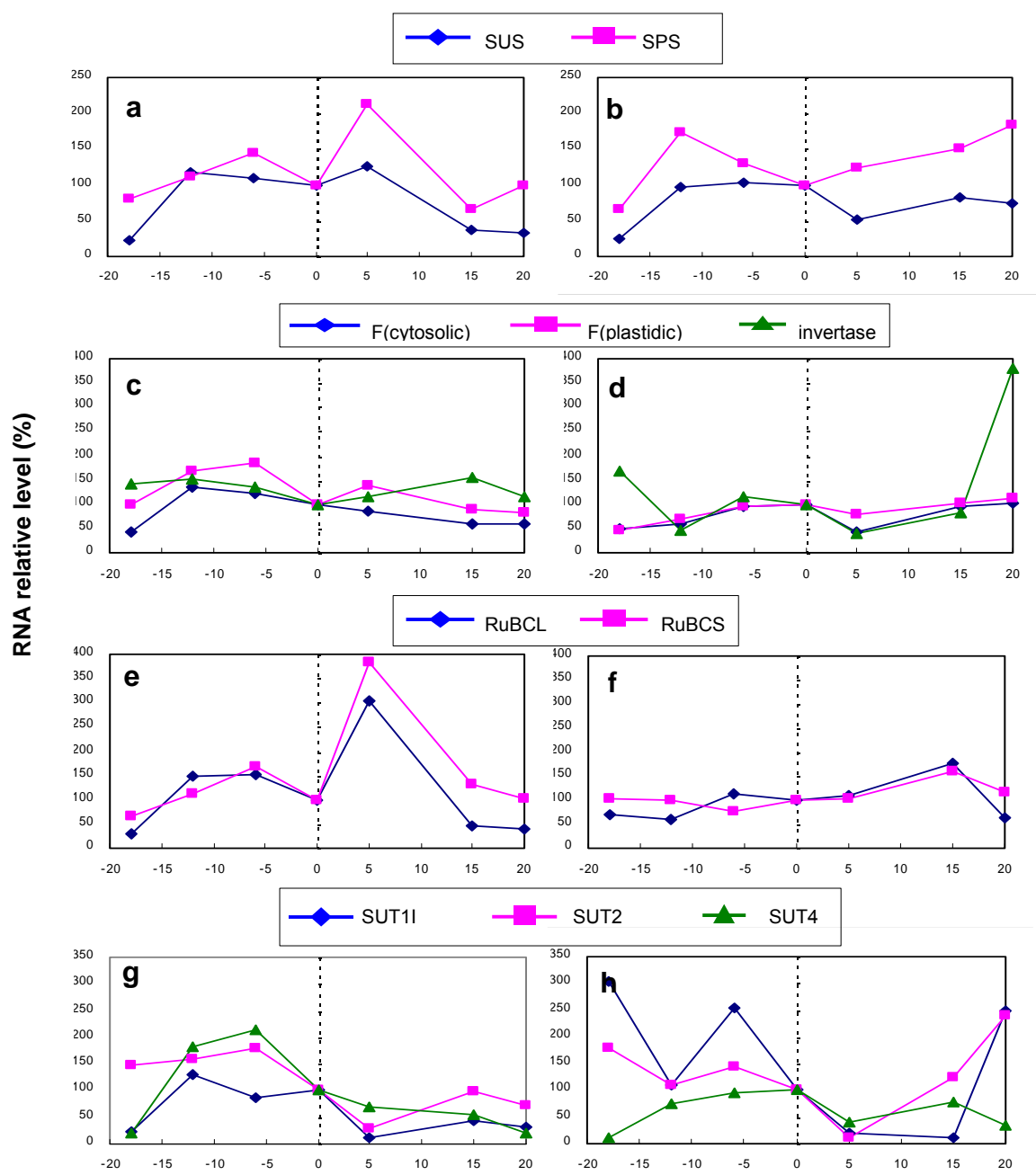


圖三. 劍葉葉鞘 (a)及 -2 葉葉鞘 (b)中澱粉代謝相關基因在抽穗期前後的表現:菱形線條為 α -amylase、正方形線條為 β -amylase、三角形線條為 *debranching enzyme* 的基因表現情況。

蔗糖代謝相關基因在抽穗期間的表現

我們觀察蔗糖代謝相關的基因有:光合作用相關基因 RuBisCO large (*RuBCL*)及 small subunit (*RuBCS*); 與蔗糖合成相關的 *sucrose synthase (SUS)*、*invertase* 及 *sucrose phosphate synthase (SPS)*; cytosolic form (*Fc*)及 plastidic form (*Fp*) *fructose-1,6-bisphosphatase* 以及 *sucrose transporter (SUT)*。基因表現的結果顯示, 在劍葉葉鞘中, *SUS* 及 *SPS* 都會在抽穗前表現量稍微上升, 到抽穗後持續上升一段時間後, 從抽穗後 5 天後下降 (圖四 a)。 -2 葉葉鞘中的 *SUS* 抽穗前會上升, 到

抽穗後表現量下降，而 *SPS* 表現量在抽穗前會上升，抽穗之後表現持續上升 (圖四 b)。劍葉葉鞘中，*Fc*、*Fp* 及 *invertase* 的表現在抽穗前後變化不大 (圖四 c)。在 -2 葉葉鞘中的 *Fc* 及 *Fp* 也在抽穗期間沒有明顯改變，而 *invertase* 則是在抽穗前沒有變化，直到抽穗 15 後，表現量大量提升 (圖四 d)。RuBCL 及 RuBCS 不論是在劍葉葉鞘或是 -2 葉葉鞘均為抽穗後表現量高於抽穗前的表現 (圖四 e, f)。Sucrose transporter gene families 在劍葉葉鞘中的表現均相似，其在抽穗前 10~15 天表現量會上升，之後便持續降低到抽穗後 20 天為止 (圖四 g)。在 -2 葉葉鞘中，*SUT1* 及 *SUT2* 則在抽穗前表現量微微上升，至抽穗期下降，等到抽穗後 15 天又上升 (圖四 h)。而 *SUT4* 則是在抽穗前表現量稍微提升，抽穗之後表現量即下降 (圖四 h)。



Flag leaf sheath

(-2) leaf sheath

Days after heading

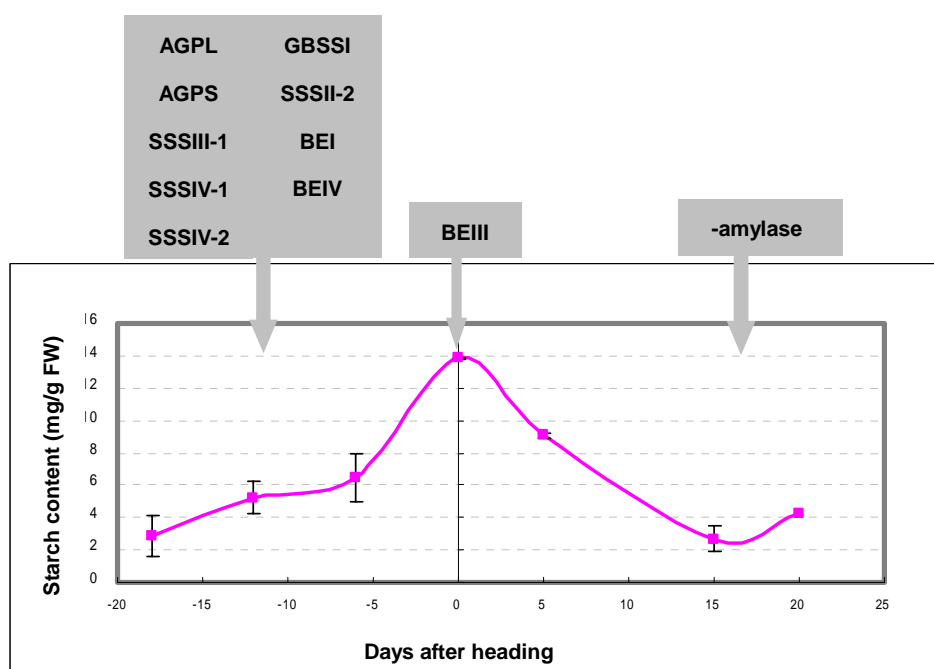
圖四. 劍葉葉鞘 (a,c,e,g) 及 -2 葉葉鞘 (b,d,f,h) 中蔗糖代謝相關基因表現情形。

討論

澱粉在抽穗前大量累積，在抽穗之後迅速降解，是 sink-source transition 的明顯特徵，藉由澱粉含量分析的結果，我們認為 TNG67 號水稻的 -2 葉葉鞘為主要的暫時性儲存組織。但是暫時性儲存組織其 sink-source transition 的調控到現在為止仍不清楚。分析澱粉代謝相關基因的表現，我們挑出和葉鞘澱粉在抽穗期前後含量變化相關的基因，並依照表現形式不同將之分成三大類 (圖五)，第一類包含 *AGPL*, *AGPS*, *SSS II-2, III, IV-1, IV-2*, *GBSS I*, *BEI* 及 *BE IV*，他們的表現量均是在抽穗前會提高，抽穗之後表現量下降。第二類為 *BE III*，其表現形式也是在抽穗前表現量會上升，抽穗之後表現量下降，且其變化趨勢和葉鞘澱粉在抽穗期間含量變化成正相關。第三類型為 *-amylase*，此澱粉分解相關基因是在抽穗後 15 天表現量達到最高峰。前兩類是和澱粉合成相關的酵素，其基因表現在抽穗前達到高峰，而葉鞘澱粉含量變化也是在抽穗前上升，所以這些基因可能負責調控葉鞘澱粉在抽穗前的合成，並造成澱粉在抽穗前累積在葉鞘中。第三類是澱粉分解相關基因，而葉鞘中澱粉含量是在抽穗之後降解，所以 *α -amylase* 及可能為主要負責葉鞘在抽穗之後降解過程的調控機制。

植物進行光合作用之後的最終產物為蔗糖，蔗糖也是植物體中主要碳素運送的形式，並為澱粉合成之前驅物。另一方面，澱粉分解之後，也必須在轉變成蔗糖的形式，運送至需要碳水化合物的目的地，因此，蔗糖代謝在澱粉生合成的調控上也具有一定的影響力。我們觀察到蔗糖代謝相關基因 cytosolic 及質體內 *fructose-1, 6-bisphosphatase* 的表現量在抽穗時明顯達到最高峰。*sucrose phosphate synthase (SPS)*, *invertase* 及 *sucrose transporter (SUT)1, SUT2* 則是在抽穗之後提高表現量，因此 *SPS* 可能主要扮演-2 葉鞘抽穗之後 sucrose 合成的角色，而 *SUT1* 及 *SUT2* 則主要負責此時 sucrose 的傳送。

在所有澱粉合成相關基因中, *AGPL* 及 *AGPS* 的表現是屬於較早期的, 和 Hirose 的實驗結果一致 (Hirose, 1999)。 *GBSSI* 最早是發現在儲藏性的組織中 (例如: 胚乳), 而 *GBSSII* 則是表現在非儲存性的組織 (例如: 葉部), 在我們的實驗裡, 葉鞘中可以偵測到兩種基因, 但是 *GBSSI* 的表現和澱粉含量變化較為相關, 所以其可能並非為儲存性組織專一表現的基因 (Weimin, 2003)。 Hirose 在之前的研究中, 就曾指出葉鞘中 *SSS* 及 *BE* 基因表現會在抽穗前上升, 在我們實驗中詳細針對不同基因成員逐步分析, 發現並非所有基因都是相同表現趨勢。我們將進而分析這些基因表現調控機制, 期能對水稻暫時性儲存組織的 sink-source 轉換機制有更進一步的了解。



圖五. 水稻葉鞘中澱粉含量在抽穗期前後的變化及可能參與調控的澱粉代謝相關基因。

參考文獻

Cock, J. H., and Youshida, S. (1972) Accumulation of ^{14}C -labeled carbohydrate before flowering and its subsequent redistribution and respiration in the rice plant. *Proceedings of the Crop Science Society of Japan* 41, 226-234

Hirose T., Endler, A., and Ohsugi, R. (1999) Gene expression of enzymes for starch and sucrose metabolism and transport in leaf sheaths of rice (*Oryza sativa L.*)

during the heading period in relation to the sink to source transition. *Plant Production Science* 2(3), 178-183

Ken, I., Makoto, K., Haruto, S., and Takayuki, K. (2004) Leaf contents differ depending on the position in a rice leaf sheath during sink-source transition. *Plant Physiology and Biochemistry* 42, 855-860

Ken, I. (2003) Identification of a Locus Increasing Rice Yield and Physiological Analysis of Its Function. *Plant Physiology* 133, 1083-1090

Martin, C., and Smith, A. M. (1995) Starch biosynthesis. *The Plant Cell* 7, 971-985

Perez, C. M., Palmiano, E. P., Baun, L., and Juliano, B. O. (1971) Starch metabolism in the leaf sheaths and culm of rice. *Plant Physiology* 47, 404-408

Smith, A. M., Danyer, K., and Martin, C. R. (1995) What controls the amount and structure of starch in storage organs. *Plant Physiology* 107, 673-677

Tomlinson, K. L., Lloyd, J. R. and Smith, A. M. (1997) Importance of isoforms of starch-branching enzyme in determining the structure of starch in pea leaves. *Plant Journal* 11, 31-43

Weimin, D., Huawu, J., Qingshuang, C., Feiyang, L., and Ping, W. (2003) Cloning and characterization of the granule-bound starch synthase II gene in rice: gene expression is regulated by the nitrogen level, sugar and circadian rhythm. *Planta* 218, 261-268