

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

溫度逆境下植物基因產物蛋白質的生理功能(2/3) *ABRC* gene expression regulated by low temperature

計畫編號: NSC 87-2311-B-002-018-B01

執行期限: 86年08月01日至87年07月31日

主持人: 劉麗飛教授 台灣大學農藝系

一、中文摘要

本子計畫利用粒子槍法將 *HVA22* 基因啟動子之 ABRC1 (ABA-Response Complex 1) 調控序列, 接上 *Amy64* 最小啟動子, 再以 *GUS* 為報導基因, 轉殖到水稻中, 以觀察 ABRC1 調控序列在水稻中的表現。從 PCR 及南方氏墨點分析的結果顯示, 共得到 3 個攜帶有 3 套 ABRC1 及 2 個攜帶有 4 套 ABRC1 的轉殖懸浮細胞系; 在不同的 ABA 濃度及時間處理後, *GUS* 酵素活性之表現隨著 ABA 濃度提高及處理時間增長而大幅提高。在 *GUS* 組織化學染色分析中施以 20 μ M ABA 處理, 則可明顯的提高 *GUS* 在根部、葉片及花藥中的表現, 此結果亦見於其植株後代(T₁), 以上結果證實了 ABRC1 序列可以在轉殖水稻中受 ABA 調控, 且能穩定的遺傳至後代。另一方面, 若將外加 ABA 處理改成以 1% 鹽或 4 低溫處理時, 亦可提高 *GUS* 的表現, 但誘導表現的幅度不若 ABA 處理明顯。

關鍵詞: ABA, ABRC, 粒子槍, *GUS*

Abstract

This project was conducted to explore the regulation and expression of ABA response complex1 (ABRC1) which was cloned from the promoter region of barley *HVA22* gene. Four

plasmids were used in this study which contain 1-4 copies of ABRC1, each was followed by *Amy64* minimal promoter, and *GUS* reporter gene. From PCR and Southern blot, it revealed that 3 and 2 independent transformed cell lines harboring 3 and 4 copies of ABRC1, respectively, were available. Time course and ABA treatment assays showed that promotion of *GUS* activity was correlated with higher ABA concentration and longer treatment time. In histochemical analysis on T₀ and T₁ plants, *GUS* expression was enhanced by 20 μ M ABA drastically in roots, leaves and anthers. Besides, 1% sodium chloride or chilling could also increase *GUS* expression, but were not as good as ABA treatment.

Keyword: ABA, ABRC, particle bombardment, *GUS*

二、緣由與目的

離層酸 (Abscisic acid, ABA) 是可以在植物體內自然合成的荷爾蒙, 參與植物生長與發育過程中許多生理代謝的調節, 其中最重要的包括種子形成和植物對逆境的反應。關於離層酸與低溫抗性的研究相當多早期的研究主要探討低溫下離層酸含量增加

(2,4,5)，外加離層酸可提高植物全株或培養細胞的耐冷性(1)，及內生離層酸含量高低與耐冷性強弱間的關係(6)等，近年來則由於分子生物學技術發展，對於離層酸調控基因表現，及促進耐冷性的機制方面，逐漸開始有深入分子層次的研究。

自1980年代起，已由許多植物中分離出受 ABA 誘導而表現的基因，例如由小麥發育胚選殖的 *Em* (7)、水稻的 *rab16* (8)、玉米的 *rab17* (14)、及大麥糊粉層選殖的 *HVA1*、*HVA22*.....等基因。為了解這些基因的表現，可進行啟動子分析，以期尋找到 ABA 能辨識的 DNA 序列，即 ABA 反應元素(ABA-response element, ABRE)，及由反式因子(*trans*-acting factor)中，尋找到可以與 ABRE 結合的蛋白質(ABRE binding protein, ABREBP)。

目前為止，已經證實有許多經由 ABA 誘導而表現之基因中確實有 ABRE，這些被找到的 ABRE 都有一個共同的特徵，即在 ABRE 內都含有 ACGT 為中心的類似 G-box 序列(3,13)。除此之外，在大麥糊粉層 ABA 誘導表現而選殖出來的 *HVA22* 基因中發現，在其 ABRE3 下游約 20 個鹼基的位置，有一段 TGCCACCGG 序列，稱為 CE1，若把包含有 ABRE3 及 CE1 的 49 個鹼基調控序列片段(稱為 ABRC1)，接上 *Amy64* minimal 啟動子，來驅動 *GUS* 報導基因，將基因轉殖到大麥幼胚，分析基因之短暫性表現，經 ABA 處理後，*GUS* 活性會隨著此片段套數(copy)增加而提高，只有一個套數時，比對照組增加 20-30 倍，如果同時接上四個套數，活性更比對照組高了 130 倍(10,11)。因此經過這樣的改造後，可以更增強 ABA 對基因表現的調控，若在這種啟動子後面連接上有用的基因，使其在 ABA 調控下大量表現產物，將是很有效的表達系統。不過以上結果係短暫性表

現之分析，未來應建立轉殖植株，觀察基因是否具有同樣的穩定性表現，以期進一步探討是否可受 ABA 及低溫逆境的調控。

目前在大麥轉殖植株的研究上，尚未建立理想的轉殖系統，因此無法利用大麥進行這方面的試驗。而本研究室過去在水稻未成熟胚的再生培養上，已有相當好的基礎，並且也建立了粒子槍轉殖水稻的條件，因此本計畫以水稻為材料，嘗試將分別含有 1-4 個套數的 ABRC 1 調控序列，各接上 *Amy64* minimal 啟動子，再以 *GUS* 作為報導基因，利用粒子槍轉殖到水稻中，以期從轉殖植株中觀察 ABRC1 調控序列在轉殖水稻中受 ABA 及低溫逆境誘導表現的情形。

三、結果與討論

本計畫以水稻為材料，分別將含有 1-4 個套數的 ABRC 調控序列，各接上 *Amy64* 最小啟動子，再以 *GUS* 為報導基因，利用粒子槍法轉殖到水稻中，觀察 ABRC 調控序列在水稻中的表現，並比較植株中含不同套數 ABRC 調控序列之表現是否與暫時性表現具一致性。

結果顯示，所構築的 4 個質體都不需要經過 ABA 處理，即能正常的在水稻幼胚中表現，表示水稻幼胚內可能已經有足以誘導 ABRC 調控序列的 ABA 濃度，最後將篩選所得到的部份細胞培養成懸浮細胞，一部份使植株再生，從分析結果顯示轉殖 3 套 ABRC1 的懸浮細胞中，以 PCR 擴增發現在 3 個抗 hygromycin 的細胞系中，都有擴增出轉殖的片段；在 4 套 ABRC/*GUS* 的轉殖細胞系中，得到 2 個抗 hygromycin 的轉殖系，證明了外來的基因成功的插入植物基因中。

將轉殖的懸浮細胞，在細胞系建立四個月時施以 20 μ M ABA 處理

24小時後，進行 GUS 組織化學染色，帶1 個套數 ABRC1 的 2 個懸浮細胞系中，GUS 活性分別提高了 12 倍及 22 倍；2 個套數 ABRC1 的 2 個懸浮細胞系中，GUS 活性分別提高了 9 倍及 68 倍；3 個套數 ABRC1 的 2 個懸浮細胞系中，GUS 活性分別提高了 312 倍及 220 倍；而帶有 4 個套數 ABRC1 的 2 個懸浮細胞系中，GUS 活性分別提高了 150 倍及 211 倍；在細胞系建立六個月時，僅施以 1 μ M ABA 處理 3 小時 3 個套數 ABRC1 的懸浮細胞系，GUS 活性即能提高 45 倍；但是在細胞系建立七個月後，再施以 20 μ M ABA 處理後，各細胞系雖然仍可受 ABA 誘導而提高 GUS 表現，但所誘導的活性比三個月前處理的材料低了 2-3 倍，此差異是否因培養時間增長後外來基因逐漸甲基化(9)使基因表現減弱，或是因為粒子槍轉殖的細胞本身具有鑲嵌的表現，導致細胞分裂後，一些無 GUS 表現的細胞增多，而稀釋了 GUS 活性所致，仍待未來的研究與探討。

在轉殖植株的表現方面，1 個套數 ABRC1 共得到 4 個獨立的轉殖系，共得 19 株再生株；2 個套數 ABRC1 共得到有 3 個轉殖系，共得 21 株再生株；3 個套數 ABRC1 得到有 4 個轉殖系，共得到 29 株再生株；4 個套數 ABRC1 得到有 3 個轉殖系，共得到 17 株再生株，若各取 1-4 株植株的葉片染色體組 DNA 進行 PCR 擴增，結果顯示轉殖 1-4 套 ABRC1 的植株系都各有 2 個植株系有擴增片段，其中最早再生出含有 3 個套數 ABRC1 的植株系的 4 個後代仍有 PCR 的擴增片段產生。另外，在 3 套 ABRC1 的轉殖株根部、葉片及生殖生長期中的花藥中，施以 20 μ M ABA 處理，並進行 GUS 組織化學染色，由結果顯示，未處理 ABA 時根部、葉片及花藥中就會有 GUS 表現，當

ABA 處理後，可明顯的提高 GUS 在根部、葉片及花藥中的表現，其所結成之 T₁ 種子播種於無菌含有 hygromycin 的培養基中一星期後，有 75% 抗 hygromycin 的種子會生成小苗，在 GUS 組織化學染色結果顯示，在 20 μ M ABA 處理後，仍可比未處理者明顯的提高 GUS 在根部及葉片中的表現，而活性最多分別可提高至 127 倍及 76 倍。

在 T₁ 子代植株中，若施以 1% 鹽害或低溫處理也會提高 GUS 的表現，但其 GUS 的表現不若以 ABA 處理那麼明顯，可能的原因是轉殖的植株仍為鑲嵌的狀態，導致受逆境誘導的表現較弱。總的來說，在表現位置上 GUS 基因的表現並不具組織專一性，但其 GUS 基因可穩定的遺傳至 T₁ 子代，同時不改變植株的農藝性狀。未來將從轉殖的後代中挑選基因表現較為均質(homogenous) 的植株進行分析，以期找出對低溫等逆境反應較強之植株進行分析。

四、計畫成果自評

以本計畫執行結果而言，證明了 ABRC 可穩定的在轉殖細胞與植株中受 ABA 誘導而表現，且其表現能穩定的遺傳至 T₁ 子代。在懸浮細胞系的表現方面，只要經由低濃度 ABA 及短時間的處理就可明顯的提高 GUS 的表現，因此可以此條件作為日後快速檢測細胞在轉殖後，其表現是否仍穩定存在於轉殖系中的方法。此外，GUS 活性與所轉入之 ABRC 套數間的關係大致上與轉入大麥幼胚中相似，即多套數的 GUS 活性比單套數者高，所以可依欲轉入基因之不同需要，而選擇接上不同套數的 ABRC 調控序列。

五、參考文獻

1. **Chen, T.H.H., and Gusta, L.V.**
(1993) Abscisic acid induced freezing resistance of cultured plant cells. *Plant Physiol.* 73 : 71-75
- 2.. **Dae, J., and Campell, W.F.** (1981)
Response of tomato plants to stressful temperatures. *Plant Physiol.* 67 : 26-29
3. **Gultinan, M.J., Marcotte, W.R., Jr., and Quatrano, R.S.** (1990). A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. *Science* 250, 267-271
4. **Lee, T.M., Lur, H.S., and Chu, C**
(1991) Involvement of abscisic acid in chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedling. *Plant Physiol.* 5 : 1113-
5. **Lee, T.M., Lur, H.S., and Chu, C**
(1993) Role of abscisic acid in chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. I. Endogenous abscisic acid levels. *Plant, Cell and Env.* 16 : 481-490
6. **Lee, T.M., Lur, H.S., and Chu, C**
(1995) Abscisic acid and putrescine accumulation in chilling-tolerant rice cultivars. *Crop Sci.* 35 : 502-508
7. **Marcotte, J.W.R., Russel, S.H., and Quatrano, R.** (1989) Abscisic acid-responsive sequences from the *Em* gene of wheat. *Plant Cell* 1, 969-976.
8. **Mundy, J., and Chua, N.H.** (1988). Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. *EMBO J.* 7, 2279-2286.
9. **Philips, R. L., Kaeppler S.M., Olhoft, P.** (1994) Genetic instability of plant tissue cultures : Breakdown of normal controls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 5222-5226.
10. **Shen, Q., Uknes, S.J., and Ho, T.H.D.** (1993) Hormone response complex of a novel abscisic acid and cycloheximide inducible barley gene. *J. Biol. Chem.* 268,23652-23660.
11. **Shen, Q., and Ho, T.H.D.** (1995) Functional desiccation of an abscisic acid (ABA)- inducible gene reveals two independent ABA-responsive complexes each containing a G-box and a novel *cis*-acting element. *Plant Cell* 7, 295-307.
- 12.. **Skriver, K., and Mundy, J.** (1990) Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell* 2, 503-512.
13. **Skriver, K., Olsen, F.L., Rogers, J.C., and Mundy, J.** (1991) *Cis*-acting DNA elements responsive to gibberellin and its antagonist abscisic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 ,7266-7270
14. **Vilardell, J., Goday, A., Freire, M.A., Torrent, M., Martinez, M.C., Torne, J.M., and Pages, M.** (1990) Gene sequence, developmental expression, and protein phosphorylation of RAB-17 in maize. *Plant Mol. Biol.* 14, 423-432.