

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

水稻培養細胞中碳水化合物代謝之研究 (1/3)

Carbohydrate Metabolism in Rice Tissue Culture

計畫編號：NSC 87-2313-B-002-102-A06

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 國立台灣大學農藝系

一、中文摘要

植物細胞具分化全能性，亦即可經由培養條件的調整，使單一細胞再生為完整植株。惟至目前為止，對此分化全能性機制的了解仍極有限。本計畫曾以水稻培養細胞為材料，探討滲透壓誘導植株再生過程中碳水化合物代謝之角色。本研究室其他的研究，也已證明在水稻的細胞培養系統中，滲透壓會提高細胞內 IAA、ABA 之含量。此兩者之變化均與植株再生有密切相關。因此，本試驗乃進一步探討內生植物荷爾蒙與碳水化合物代謝，在滲透壓誘導水稻癒合組織植株再生過程中的角色。試驗結果發現，台南 5 號未成熟胚在同時含有 IAA 合成前驅物 anthranilic acid 及 ABA 的 MSD₁₀ 培養基中誘導之癒合組織 (TN5-AnA)，其生長明顯減緩，細胞內水分含量及水勢、滲透勢也明顯低於沒有外加植物荷爾蒙處理者 (TN5)；將此癒合組織移入分化培養基後，可大幅提高植株再分化能力，此現象與高濃度滲透壓處理者相符。此外，TN5-AnA 在癒合組織誘導階段，細胞內可溶性糖與澱粉含量均顯著高於 TN5 處理者，上述結果暗示，外加植物荷爾蒙處理，似乎可取代高濃度滲透壓處理，影響水稻癒合組織中內生

植物荷爾蒙與碳水化合物之代謝，誘導植株之再生。因此推測，高濃度滲透壓處理可能導致細胞內 IAA 及 ABA 含量提高，藉由這兩種植物荷爾蒙作為訊息傳導因子，調控碳水化合物之代謝，進一步影響植株之再生。本研究將再進一步分析此外加植物荷爾蒙處理者，其碳水化合物代謝相關酵素之活性與蛋白質表現情形。

關鍵詞：碳水化合物代謝、水稻、組織培養、滲透壓逆境

Abstract

Plant cells possess totipotency that means whole plants could be regenerated from single cell by modulating culture conditions. The mechanisms of totipotency, however, were limitedly understood so far. The purpose of this project is to explore the possible roles of carbohydrate metabolism in osmotic-stressed rice callus during shoot regeneration. After thorough studies, we already got good understanding of the changes of soluble sugars, starch, and the enzymes related to sugar and starch metabolisms. From the other study in our lab, it had found

the contents of endogenous IAA and ABA were increased significantly in rice callus by osmotic stress treatment, and were correlated to the ability of shoot regeneration. We, therefore, did further studies to explore the correlation among phytohormones, carbohydrate metabolism and osmotic stress during shoot regeneration.

Two Kinds of callus were used in the studies. TN5 callus was induced on MSD₁₀ basal medium and used as control. TN5-AnA callus was induced on MSD₁₀ basal medium containing 2mM anthranilic acid and 100 μ M ABA. The results showed that during callus induction stage, TN5-AnA callus has lower callus growth rate, cellular water content, water potential, and osmotic potential than TN5 callus. After being transferred to regeneration medium, TN5-AnA showed prosperous shoot regeneration. Besides, both soluble sugars and starch contents are prominently higher in TN5-AnA callus. All these phenomenon in TN5-AnA callus are similar to those in osmotic-stressed callus. It proved that the osmotic stress could be replaced with the treatment of exogenous phytohormones to induce shoot regeneration feature. Therefore, we proposed that osmotic stress might affect the contents of endogenous IAA and ABA which serve as signals to regulate carbohydrate metabolism, and finally cause the shoot regeneration of rice callus.

Keywords: carbohydrate metabolism, rice, tissue culture, osmotic stress

二、緣由與目的

植物細胞具分化全能性，亦即可經由培養條件的調整，使單一的細胞再生為完整植株。此現象已廣泛應用於植物的大量繁殖及遺傳工程改良植物性狀上。對此分化全能性的研究已逾四十年，早期主要著重在分化條件的探討，亦即在培養基中添加不同量或不同比例植物荷爾蒙、各種碳源或營養添加物等，觀察對植株再生的影響；近年來則著重在和此分化全能性有關之基因選殖、及基因表現的研究上。然而相關研究雖多，對於分化的機制，至今仍未有定論。

本研究室過去的試驗中發現，水稻的培養細胞經滲透壓處理後可明顯促進植株再分化能力(5, 6)；近來的研究也顯示碳水化合物代謝與此分化能力有密切相關。試驗結果發現，此植株再生的系統在滲透壓逆境下，和蔗糖進入細胞有密切相關的 Bound-IT 活性顯著提高，造成細胞內可溶性糖含量明顯提高，此結果會抑制澱粉水解酵素表現，導致澱粉含量提高。在分化初期，蔗糖分解相關酵素活性逐漸升高，蔗糖含量逐漸下降，而葡萄糖急遽升高；分化後期，細胞內可溶性糖含量逐漸下降，澱粉水解酵素大量被誘導，分解累積在細胞中的澱粉，提供芽體形成所需能量及還原力來源。顯然地，滲透壓逆境可引發一連串碳水化合物代謝作用的改變，而導致植株再生；然而，滲透壓逆境是直接影響或是透過某些訊息傳遞因子

(signal transduction factors) 而調控這些代謝相關酵素的表現呢？另外，此滲透壓逆境調控碳水化合物代謝作用的改變，而誘導植株再生的現象，可否經由其他非滲透壓逆境的處理而達成呢？這些都是非常值得深入探討的問題。

植物生長調節物質，pH 休克(pH shock)、熱休克(heat shock)，碳源及其他化學物質處理等等，都可能和分化全能性的驅動有關(14)。80 年代以前，外加 Cytokinin/Auxin 不同比例調控胡蘿蔔細胞分裂或分化的理論廣被接受，後來發現此理論並無法完全適用於多數物種。Thorpe 的研究群指出滲透壓和菸草癒合組織芽體分化有關(1,11,12)；本研究室早期研究也發現，不具植株再生能力的水稻培養細胞經高濃度滲透壓逆境處理後可大幅提高分化率(5,6)。近年來，內生性植物荷爾蒙調控植株再生的研究逐漸受到重視，Michalzuk 等人(8)及 Ivanova 等人(4) 分別在胡蘿蔔及苜蓿培養中發現，具體胚形成能力的細胞內有較高 IAA 含量，當體胚形成過程中，IAA 含量有急速下降的現象。本研究室近期的研究也發現滲透壓逆境所誘導之高分化率水稻癒合組織內，IAA 及 ABA 含量明顯高於不具分化能力者，將其移到分化培養基後，此內生 IAA 及 ABA 含量迅速降低。進一步利用外加 IAA 生合成前驅物，Anthranilic acid 或 tryptophan 處理取代滲透壓處理，發現僅有 anthranilic acid 處理可提高內生 IAA 含量，對分化率也僅有稍微促進效果；若進一步以外加 ABA 配合 anthranilic acid 處理，則可同時提高細胞內 IAA 及

ABA 含量，此癒合組織移到分化培養基後，IAA 與 ABA 含量很快降低且可大幅提高分化率到 50% 以上，此現象與滲透壓處理者雷同；也進一步確認 ABA 與 IAA 共同在水稻培養細胞再生植株過程中的重要性。但是，此內生荷爾蒙含量之變化，如何調控植株再生或體胚形成，則仍不清楚。

至於滲透壓逆境下，內生 IAA 及 ABA 含量之變化，碳水化合物之代謝與植株再生三者間之關係，實為一非常有趣且重要的問題，目前為止，並沒有任何相關的報導。由於本研究室最近發展出的系統，在水稻癒合組織誘導時，同時外加 IAA 生合成前驅物與 ABA 處理，可誘導植株的再生，且可模擬滲透壓處理時細胞內的生理狀況，極適合用來探討此一問題。另外，此添加 IAA 生合成前驅物與 ABA 的培養基並不具滲透壓的效果，也可用來與上述滲透壓逆境誘導之植株再生過程中，碳水化合物含量變化與其代謝相關酵素之表現，作一比較。預期將可進一步了解內生植物荷爾蒙含量與碳水化合物代謝在滲透壓誘導水稻癒合組織植株再生過程中所扮演之角色。

三、結果與討論

TN5 在同時含有 anthranilic acid 及 ABA 的 MSD₁₀ 培養基中 (TN5-AnA) 培養，癒合組織生長顯著受到抑制，由外表性狀觀察發現 TN5-AnA 處理，非常類似滲透壓逆境處理的結果，癒合組織較白，且結構較緊密，而 TN5 外觀則呈現鮮黃色，且組織較為鬆散，TN5 在培養 4 週後平均每個

癒合組織可達 110 mg 左右，而 TN5-AnA 約只有 20 mg。兩種處理下生長 2 週的癒合組織移到分化培養基中分別培養 4 週，調查其分化率，結果 TN5-AnA 分化率可大幅提高到 83%，而 TN5 只有少數有根的分化，完全沒有芽體再生。另外，癒合組織誘導時 TN5-AnA 處理，細胞內水分含量明顯降低，且不像 TN5 有隨培養天數增加逐漸升高的現象；將 TN5-AnA 癒合組織移至分化培養基後，則隨培養天數增加水分含量逐漸上升，而 TN5 水分含量則沒有明顯變化。

分別選取 TN5 及 TN5-AnA 二週齡癒合組織測定其細胞內水勢、滲透勢變化，發現 TN5-AnA 處理者，水勢滲透勢明顯降低。由於含 anthranilic acid 及 ABA 的 MSD₁₀ 培養基並不會明顯改變培養基水勢，然而在此培養基中所誘導之癒合組織水勢、滲透勢卻明顯降低，顯示此外加植物荷爾蒙的處理，會明顯影響細胞內某些滲透調節物質之代謝，如可溶性碳水化合物之代謝。此降低水勢、滲透勢的現象，也和高濃度滲透壓逆境處理者類似。

在癒合組織誘導階段，高分化能力的 TN5-AnA 細胞內蔗糖、葡萄糖及澱粉含量均顯著高於 TN5 處理者。將其分別移入分化培養基後，TN5-AnA 內蔗糖含量逐漸減少，分化後期甚至低於 TN5 處理者；葡萄糖含量緩慢下降，但始終高於 TN5，尤其是分化初期。另外，其澱粉含量亦隨培養時間增加而逐漸下降，至第 11 天後，才大幅減少。反之，不具分化能力的 TN5 處理者，在植株再生階段，蔗糖、葡萄糖、及澱粉含量均沒

有顯著變化。

綜合上述結果，不論是癒合組織的生長、外部形態、細胞內水分狀態、植株再生能力、乃至培養過程中蔗糖、葡萄糖、及澱粉的含量與變化，以外加 IAA 合成前驅物 anthranilic acid 及 ABA 處理者，均與高濃度滲透壓處理者有類似的表現。因為 TN5-AnA 處理，並未改變培養基之水勢，直接對癒合組織提供高滲透壓環境，卻可引發和高濃度滲透壓處理者一致的生理變化。由本研究室近來其他相關的研究也已證明，此兩種不同處理，均可導致細胞內 IAA 及 ABA 含量顯著提高，再配合本研究發現的兩者碳水化合物含量類似的變化，推測，高濃度滲透壓處理可能導致細胞內 IAA 及 ABA 含量提高，藉由這兩種植物荷爾蒙作為訊息傳導因子，調控碳水化合物之代謝，進一步影響植株之再生。本研究現正進一步分析此外加植物荷爾蒙處理者，其碳水化合物代謝相關酵素之活性與蛋白質表現情形，若仍能與高濃度滲透壓處理者有類似之表現，即能印證上述之推論；反之，如果兩種處理引發碳水化合物代謝相關酵素不同之表現，卻能造成類似的含量變化，誘導植株之再生，也是一全新的發現，將可對植物分化全能性之機制有進一步的了解。

四 計畫成果自評

經過四年的研究，本計畫除已建立水稻細胞高植株再生率培養系統外，更進一步對滲透壓調控碳水化合物代謝，進而誘導水稻培養細胞植株再生的機制有深入的了解，與計畫預

期成果相符，甚至有更深入的探討。由於水稻是國內目前最重要的栽培作物，近年來，利用遺傳工程技術改良水稻品種的研究正快速發展中，亟需有高分化能力的植株再生系統配合，本計畫中所建立以高濃度蔗糖或甘露糖醇處理誘導植株再生的系統，極適合應用於遺傳工程研究中。此外，由於滲透壓下誘導植株再生之機制的研究並不多，本計畫已發現高滲透壓下，可經由碳水化合物代謝之調控而影響植株之再生，本研究進一步發現，此高濃度滲透壓處理可能先提高細胞內 IAA 與 ABA 含量，再進一步調控碳水化合物代謝而影響植株之再生。

五、參考文獻

1. Brown DCW, DWM Leung and TA Thorpe. 1979. Osmotic requirement for shoot formation in tobacco callus. *Physiol Pl* 46: 36-41.
2. Etienne H, A Berger and MP Carron. 1991. Water status of callus from *Hevea brasiliensis* during induction of somatic embryogenesis. *Physiol Pl* 82: 213-218.
3. Ho WJ and IK Vasil. 1983. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L): Growth and plant regeneration from embryogenic cell suspension cultures. *Ann Bot* 51: 719-726.
4. Ivanova A, Velcheva M, Denchev P, Atanassov A, and HA Van Onckelen. 1994. Endogenous hormone levels during direct somatic embryogenesis in *Medicago falcata*. *Physiol Pl* 92: 85-89.
5. Lai KL and LF Liu. 1988. Increased plant regeneration frequency in water-stressed rice tissue cultures. *Jpn J Crop Sci* 57: 553-557.
6. Liu LF and KL Lai. 1991. Enhancement of regeneration in rice tissue cultures by water and salt stress. In "Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol 14 Rice" Ed. Bajaj, YPS. pp. 47-57. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
7. Mangat BS, MK Pelekis and AC Cassells. 1990. Changes in the starch content during organogenesis in *in vitro* cultured *Begonia rex* stem explants. *Physiol Pl* 79: 267-274.
8. Michalczuk L, Cooke TJ, and JD Cohen. 1992. Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis. *Phytochemistry* 31: 1097-1103.
9. Misra S, SM Attree, I Leal and LC Fowke. 1993. Effect of abscisic acid, osmotic, and desiccation on synthesis of storage proteins during the development of white spruce somatic embryos. *Ann Bot* 71: 11-22.
10. Swellund B and RD Locy. 1993. Sorbital as the primary carbon source for the growth of embryogenic callus of maize. *Pl Physiol* 103: 1339-1346.
11. Thorpe TA, RW Joy and DWM Leung. 1986. Starch turnover in

- shoot-forming tobacco callus. *Physiol Pl* 66: 58-62.
12. Thorpe TA and DD Meier. 1974. Starch metabolism in shoot-forming tobacco callus. *J Exp Bot* 25: 288-294.
13. Trip P, G Krotkov and CD Nelson. 1964. Metabolism of mannitol in higher plants. *Amer J Bot* 51: 828-835.
14. Toonen MAJ and SC De Vries. 1996. Initiation of somatic embryos from single cells. In: *Embryogenesis, the generation of a plant*. Eds, Wang, TL and A Cuming. BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK. pp. 173-190.
15. Verma DC and DK Dougall. 1977. Influence of carbohydrates on quantitative aspects of growth and embryo formation in wild carrot suspension cultures. *Pl Physiol* 59: 81-85.