

# 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(2/3)

Carbohydrate Metabolism in Rice Tissue Culture

計畫編號：NSC 88-2313-B-002-051-A06

執行期限：87年08月01日至88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。本研究室過去的研究，證明水稻的培養細胞經滲透壓處理後，會提高細胞內 IAA、ABA 之含量，而與植株再生有密切相關。因此，本試驗乃進一步探討植物荷爾蒙與碳水化合物代謝的關係，及其滲透壓誘導水稻癒合組織植株再生過程中的角色。將台南 5 號未成熟胚培養在外加植物荷爾蒙(即同時含有 IAA 合成前驅物 anthranilic acid 及 ABA 的 MSD<sub>10</sub> 培養基中(TN5-AnA)培養)與滲透壓處理兩系統中，結果發現：1. 在癒合組織誘導階段均有較低澱粉水解酵素活性，且主要皆因  $\alpha$ -Amy( $\alpha$ -澱粉水解酵素)蛋白質合成減少之故。另外，在植株再生階段，兩系統澱粉水解酵素的表現一致。2. 兩系統澱粉代謝相關酵素的表現均類似，但蔗糖相關代謝酵素的表現則有明顯不同，其中在癒合組織誘導階段，滲透壓的系統處理下蔗糖代謝相關酵素活性均顯著被誘導，相反的，外加植物荷爾蒙的系統處理下則 SS(蔗糖合成酵素) Sol-IT(可溶性蔗糖轉化酵素)及 Bound-IT(結合性蔗糖轉化酵素)均顯著受到抑制。而在植株再生

階段，兩種處理下蔗糖分解酵素活性均比對照組高。上述結果強烈顯示滲透壓處理可能藉由內生 ABA 及 IAA 含量的改變來調控部分碳水化合物代謝相關酵素(如  $\alpha$ -Amy)的表現，達到誘導植株再生的目的。這是一全新的發現，將可對植物分化全能性之機制有進一步的了解。

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. From thorough studies, 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.

TN5-AnA callus was induced on

MSD<sub>10</sub> basal medium containing anthranilic acid and ABA. The results showed all the phenomenons were similar to those under osmotic stress treatment. Higher IAA and ABA levels inhibited all the sucrolytic enzyme (Sol-IT, Bound-IT, and SS) and amylase activity. Therefore, the higher soluble sugars and starch contents might be resulted from sucrose uptaking by sucrose transporter dominantly and inhibiting starch degradation, respectively. In conclusion, osmotic stress induced some changes of carbohydrate metabolism, and was brought about shoot regeneration. Parts of those changes were regulated by changes of endogenous IAA and ABA levels. But there are some processes induced by osmotic stress might be regulated by other factors during shoot regeneration.

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；此過程與細胞內碳水化合物代謝有密切相關。在癒合組織誘導期 Bound-IT 酵素活性顯著提高，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？這是非常值得深入探討的問題。

本研究室近期的研究進一步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。若利用外加 IAA 生合成前驅物，Anthranilic acid 及 ABA 取代滲透壓處理，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。但是，此內生荷爾蒙含量之變化，如何調控植株再生，則仍不清楚。因此本計畫乃深

入探討滲透壓逆境下，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。

### 三、結果與討論

TN5 在同時含有 anthranilic acid 及 ABA 的 MSD<sub>10</sub> 培養基中 (TN5-AnA) 培養，在癒合組織誘導階段，TN5-AnA 之 Sol-IT、Bound-IT 及 SS 三者的活性均低於 TN5；而在培養初期(第 10 天時)，TN5-AnA  $\alpha$ -Amy 活性高於 TN5 處理者，後期(第 14 天以後)，則 TN5 處理  $\alpha$ -Amy 活性顯著高於 TN5-AnA 處理者。但是到分化後期時四者的活性則均高於 TN5。另一方面，在癒合組織誘導階段，TN5-AnA SS1 及 SS2 蛋白質表現低於 TN5 者；移到分化培養基後，TN5-AnA 在分化後期 SS1 表現有逐漸增加的趨勢，並高於 TN5 者；SS2 表現在兩處理間則沒有明顯差異。不論是癒合組織誘導或植株再生階段，TN5 Bound-IT 蛋白質表現均高於 TN5-AnA 處理者；不過分化後期，TN5-AnA Bound-IT 被誘導的程度高於 TN5 處理者。癒合組織誘導階段，隨著培養天數增加 TN5  $\alpha$ -Amy 蛋白質表現逐漸增加；而 TN5-AnA 在培養初期有較高  $\alpha$ -Amy 含量，之後表現有稍微增加，但均低於 TN5 處理者。移到分化培養基後，兩處理  $\alpha$ -Amy 含量及變化趨勢差異不大。由上述相關分析發現，外加植物荷爾蒙與滲透壓處理兩系統中：1. 在癒合組織誘導階段均有較低澱粉水解酵素活性，且主要皆因  $\alpha$ -Amy 蛋白質合成減少之故。另外，在植株再生階段，兩系統澱粉水解酵素的表現一致。2. 兩系統澱粉

代謝相關酵素的表現均類似，但蔗糖相關代謝酵素的表現則有明顯不同，其中在癒合組織誘導階段，滲透壓的系統蔗糖代謝相關酵素活性均顯著被誘導，相反的，外加植物荷爾蒙的系統則 SS、Sol-IT 及 Bound-IT 均顯著受到抑制。而在植株再生階段，雖然兩系統蔗糖分解酵素活性均比對照組高，但蛋白質表現的趨勢不盡相同。

綜合上述結果，滲透壓處理與外加植物荷爾蒙兩系統，均可大幅提高水稻培養細胞植株再生的能力；雖然兩系統在分化過程中，蔗糖代謝相關酵素的表現並不一致，但澱粉代謝相關酵素的表現及整體碳水化合物含量的變化是一致的，此結果強烈暗示兩系統間有相當程度的關聯性；換句話說，滲透壓處理可能藉由內生 ABA 及 IAA 含量的改變來調控部分碳水化合物代謝相關酵素(如  $\alpha$ -Amy)的表現，達到誘導植株再生的目的。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，再配合前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。本研究此階段之結果發現兩種處理引發碳水化合物代謝相關酵素之表現雖不全然相同，卻能造成類似的含量變化，誘導植株之再生，這是一全新的發現，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

經過五年的研究，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，再進一步調控部分碳水化合物代謝相關酵素(如  $\alpha$ -Amy)的表現達到誘導植株之再生。

## 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. 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.
6. 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.
7. Thorpe TA, RW Joy and DWM Leung. 1986. Starch turnover in shoot-forming tobacco callus. *Physiol Pl* 66: 58-62.
8. Thorpe TA and DD Meier. 1974. Starch metabolism in shoot-forming tobacco callus. *J Exp Bot* 25: 288-294.
9. Trip P, G Krotkov and CD Nelson. 1964. Metabolism of mannitol in higher plants. *Amer J Bot* 51: 828-835.