

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

蔗糖合成酶對水稻穀粒累積的重要性 The Role of Sucrose Synthase for Starch Synthesis in Rice Grains

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 89-2313-B-002-053-A06

執行期間： 88 年 8 月 1 日至 89 年 7 月 31 日

計畫主持人：劉麗飛教授

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：國立台灣大學農藝系

中 華 民 國 90 年 1 月 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

蔗糖合成酶對水稻穀粒累積的重要性

The Role of Sucrose Synthase for Starch Synthesis in Rice Grains

計畫編號：NSC 89-2313-B-002-053-A06

執行期限：88年8月1日至89年7月31日

主持人：劉麗飛教授 國立台灣大學農藝系

E-mail：lfliu@ccms.ntu.edu.tw

一、中文摘要

本試驗利用免疫組織化學法分析水稻穀粒與癒合組織中三種蔗糖合成酶 SS(RSuS1, RSuS2, RSuS3)之表現，結果發現兩種組織中 RSuS1 均主要表現於輸導組織，並與癒合組織細胞內澱粉累積有關，但在穀粒累積澱粉的胚乳細胞中則只有 RSuS3 表現，此種差異表現的原因甚值得進一步探討。

關鍵詞：水稻、澱粉、蔗糖合成酶、免疫組織化學法。

Abstract

The distributions of three rice sucrose synthase (RSuS1, RSuS2, RSuS3) in rice grain and callus were studied by immunohistochemical method. The results showed RSuS1 was mainly localized in the phloem in both kinds of tissue. RSuS1 also localized in starch accumulating cells of rice callus, while only RSuS3 present in starch-containing endosperm cells of rice grain.

It is worth further studies to examine the mechanism of the differential expression of sucrose synthase genes in the different tissues.

Keywords: Rice, Starch, Sucrose synthase
Immunohistochemistry

二、緣由與目的

水稻穀粒成熟時累積澱粉作為其最重要的產物，合成澱粉的原料則主要由葉片轉運而來，因此蔗糖代謝與轉運，及澱粉合成等均會影響稻穀的產量與品質。近年來，由於對這些代謝途徑中有關酵素的研 究日漸深入，已經有少數報告探討這些酵素活性與穀粒發育及澱粉質與量的關係 (Kato, 1995; Keeling, *et al.*, 1993; Smyth & Prescott, 1989; Umamoto, *et al.*, 1994; Wei & Sung, 1993)。其中蔗糖合成酶 (sucrose synthase, EC 2.4.1.13, 以下簡稱 SS) 為一重要研究目標。

SS 可催化蔗糖合成與分解，為一可逆的反應：

$$\text{UDP-glucose} + \text{Fructose} \rightleftharpoons \text{Sucrose} + \text{UDP}$$
但大多數研究指出，SS 在植物體中主要偏向催化蔗糖分解反應。近年來有關 SS 的分子學研究進展非常迅速，已知在不同物種中 SS 均存有一個以上的同功酶。水稻方面在植株各器官中均可測得 SS 活性 (Chan, *et al.*, 1990)，至少有五種 SS 同功酶 (Su, 1996; Yen, *et al.*, 1994)，分別由三個不同基因 (*RSus1*, *RSus2*, *RSus3*) 控制 (Wang, *et al.*, 1992)，其 cDNA 及 genomic DNA 均已定序 (Wang, *et al.*, 1992; Yu, *et al.*, 1992)。

SS 是蔗糖代謝及澱粉合成反應中非常重要的酵素，其生理功能主要可提供澱粉合成之前驅物、呼吸作用基質及調節蔗糖轉運。目前對 SS 調節蔗糖轉運的功能有較具體的了解，Shi 等以水稻 *Rsus1* 基因啟動接上 *GUS* 報導基因或 *lectin* 基因，轉殖到

菸草植株中，證明 *RSus1* 基因特定表現於莖、葉及根的篩管組織，Nolte & Koch (1993)利用免疫組織化學法亦證明 SS 表現在篩管組織的伴細胞內，與蔗糖之輸出密切相關。

此外，在供源(source)與貯藏(sink)器官的糖代謝調節關係上，SS 亦有相當重要的功能，例如在番瓜果實發育上，SS 活性與果實關係密切，可作為貯庫強度的指標，並影響果實的產量與品質。在穀類作物，例如小麥、大麥、水稻等，均有報告指出 SS 活性對穀粒發育具有調節的作用，並與澱粉累積呈正相關(Kato, 1995; Patel and Mahapatra, 1996)，此外，溫度亦影響 SS 的基因表現(Crespi, *et al.*, 1991; Keeling, *et al.*, 1993; Wallwork, *et al.*, 1998)，對於溫度影響產量提供了極有意義的解釋。至於其它環境與栽培條件是否影響 SS，目前尚無報告，非常值得深入探討。

本計畫即擬以水稻為材料，利用免疫組織化學法，觀察 SS 在水稻組織與細胞中的表現，及其與澱粉累積的關係。

三、結果與討論

本試驗首先由水稻台南 5 號及矮南早 39 號幼胚，經培養得到癒合組織，分別於 14 天及 10 天後移到分化培養基，誘導植株再生，在培養過程中隔日取樣，經固定、脫水、滲腊、包埋、切片等處理後，以三種 SS(RSuS1, RSuS2, RSuS3)的單株抗體分別進行初級免疫，再用山羊抗兔子血清進行二次免疫，經放大後，利用 Alkaline phosphatase 反應呈色後，以光學顯微鏡觀察。結果發現 RSuS1 主要在輸導組織表現，包括韌皮部及假導管組織，其次也在表皮層或外圍細胞表現，另外，當細胞內累積大量澱粉粒時，RSuS1 表現增強，並與澱粉粒分布有關。而 RSuS2 在假導內只有微弱的表現，RSuS3 則幾乎不會在假導管表現。同時在澱粉累積的細胞內沒有，RSuS2 與 RSuS3 表現。

此外，由田間栽培的水稻台農 67 號植株，採取授粉後之穀粒，依上述的方法進

行免疫組織化學反應，結果發現 RSuS1 主要分佈於韌皮組織及糊粉層，少量出現在果皮及胚乳細胞。而 RSuS3 則主要只表現於含有澱粉的胚乳細胞，RSuS2 平均地表現在各種組織中。

由以上結果均顯示 SS 酵素會在水稻之韌皮部表現，在玉米及柑橘葉片中亦得到同樣結果(Nolte & Koch, 1993)，推測其功能可能是提供蔗糖轉運能量及蔗糖代謝之基質 UDPG。不過在癒合組織及穀粒中澱粉合成似乎與不同的 SS 基因表現有關，究竟是因為組織細胞不同，或品種上的差別，甚值得再詳細研究。

四、計畫成果自評

本計畫中已建立免疫組織化學法探討重要酵素的表現，這種技術非常有用，可以確實了解基因表現的位置，及其在細胞內與代謝產物的關係，未來將繼續探討其他的酵素及環境對這些酵素表現的影響。而本計畫結果意外發現水稻植株與癒合組織培養中，可能由不同的蔗糖合成酵素參與澱粉合成，亦是值得再深入探討的問題。

五、參考文獻

1. Chan, H.Y., Ling, T.Y., Juang, R.H., Ting, I.N., Sung, H.Y., and Su, J.C. 1990. Sucrose synthase in rice plants. Growth-associated changes in tissue specific distributions. *Pl Physiol* 94:1456-1461.
2. Crespi, M.D., Zabaleta, E.J., Pontis, H.G., and Salerno, G.L. 1991. Sucrose synthase expression during cold acclimation in wheat. *Pl Physiol* 96:887-891.
3. Kato, T. 1995. Change of sucrose synthase activity in developing endosperm of rice cultivars. *Crop Sci* 35:827-831.
4. Keeling, P.L., Bacon, P.J., and Holt, D.C. 1993. Elevated temperature reduces starch deposition in wheat endosperm by reducing the activity of soluble starch synthase. *Planta* 191:342-348.
5. Nolte, K.D., and Koch, K.E. 1993.

- Companion-cell specific localization of sucrose synthase in zones of phloem loading and unloading. *Pl Physiol* 101:899-905.
6. Patel, R. and Mohapatra, P.K. 1996. Assimilate partitioning within floret components of contrasting rice spikelets producing qualitatively different types of grains. *Aust J of Pl Physiol* 23: 85-92.
 7. Shi, Y., Wang, M.B., Powell, K.S., Van Damme, E., Hilder, V.A., Gatehouse, A.M.R., Boulter, D., and Gatehouse, J.A. 1994. Use of the rice sucrose synthase-1 promoter to direct phloem specific expression of *Exp Bot* 45:623-631.
 8. Smyth, D.A., and Prescott, H.E. Jr. 1989. Sugar content and activity of sucrose metabolism enzymes in milled rice grain. *Pl Physiol* 89:893-896.
 9. Su, J.C. 1996. Metabolic roles of sucrose synthase: example of rice isozymes encoded by three isogenes. In *Sucrose metabolism, biochemistry, physiology and molecular biology / Current topics in plant physiology*; 14. eds. Pontis, H.G., G.L. Salerno, and E. J. Echeverris. pp. 40-48.
 10. Umemoto, T., Nakamura, Y., and Ishikura, N. 1995. Activity of starch synthase and the amylose content in rice endosperm. *Phytochemistry* 40:1613-1616.
 11. Wallwork, M.A.B., Logue, S.J., MacLeod, L.C., and Jenner, C.F. 1998. Effect of high temperature during grain filling on starch synthesis in the developing barley grain. *Aust J of Pl Physiol* 25:173-181.
 12. Wang, A.Y., Yu, W.P., Juang, R.H., Huang, J.W., Sung, H.Y., and Su, J.C. 1992. Presence of three rice sucrose synthase genes as revealed by cloning and sequencing of cDNA. *Pl Mole Biol* 18:1191-1194.
 13. Wang, M.B., Boulter, D., and Gatehouse, J.A. 1992. A complete sequence of the rice sucrose synthase-1 (*RSus1*) gene. *Pl Mole Biol* 19:881-885.
 14. Wei, M.L. and Sung, J.M. 1993. Carbohydrate metabolism enzymes in developing grains of rice cultured in solution with calcium supplement. *Crop Sci* 33:174-177.
 15. Yen, S.F., Su, J.C., and Sung, H.Y. 1994. Purification and characterization of rice sucrose synthase isozymes. *Biochem and Mole Biol International* 34:613-620.
 16. Yu, W.P., Wang, A.Y., Juang, R.H., Sung, H.Y., and Su, J.C. 1992. Isolation and sequences of rice sucrose synthase cDNA and genomic DNA. *Pl Mole Biol* 18:139-142.