滲透壓誘導水稻癒合組織植株再生過程中過氧化酵素之變化

黃文理[1]、劉麗飛[2]*
[1] 輔英科技大學生物技術系
[2] 國立臺灣大學農藝學系

摘要

本研究主要探討水稻癒合組織植株再生過程中過氧化酵素活性與同功酵素之變化。結果顯示具高分化能力TN5-M_6癒合組織在植株再生過程中，不論是可溶性(soluble)與細胞壁結合(wall-bound)過氧化酵素活性均明顯高於不具分化能力的TN5-M_0，其中wall-bound過氧化酵素活性呈現雙高峰曲線，且其活性變化與癒合組織綠點及小苗形成有密切相關。此外，作者建立以等電點電泳分析過氧化酵素同功酵素圖譜技術，發現在移到分化培養基後第一天，具高分化能力TN5-M_6癒合組織中pI 4.5與pI 5.1同功酵素即明顯表現，而在第3天綠點形成後，pI 4.7與pI 6.2同功酵素表現愈來愈明顯，顯示癒合組織不同發育階段有不同過氧化酵素表現，極適合作為水稻癒合組織植株再生之標誌酵素。

關鍵詞：水稻、植株再生、過氧化酵素、同功酵素、等電點電泳。

Changes in Isoperoxidases in Rice (*Oryza sativa* L.) Callus During Shoot Regeneration Induced by Osmotic Stress

Wen-Lii Huang[1] and Li-Fei Liu[2]*

* 通信作者，lfliu@ntu.edu.tw
投稿日期：2005 年 10 月 10 日
接受日期：2005 年 10 月 30 日
作物、環境與生物資訊 3:1-8 (2006)
Crop, Environment & Bioinformatics 3:1-8 (2006)
189 Chung-Cheng Rd., Wufeng, Taichung Hsien 41301, Taiwan ROC

[1] Department of Biotechnology, Fooyin University, Kaohsiung Hsien 831, Taiwan ROC
[2] Department of Agronomy, National Taiwan University, Taipei 10617, Taiwan ROC

ABSTRACT

Changes of peroxidase activity and isozyme pattern in rice callus during shoot regeneration induced by osmotic stress were investigated. The results showed that shoot regeneration in rice callus was accompanied by an increase in specific activity either soluble or wall-bound peroxidase. Besides, the peroxidase isozyme patterns were separated using isoelectric focusing (IEF) electrophoresis. It showed that the pI 4.5 and pI 5.1 were predominant isozymes in TN5-M_6, the highly regenerative callus, at the first day on regeneration medium. The pI 4.7 and pI 6.2 isozymes were also significant before plantlet formation. Results indicate that different peroxidase isozymes are expressed at callus and shoot regeneration stage and can be easily monitored by IEF analysis. These isozymes are useful markers for shoot regeneration in rice callus.

Key words: *Oryza sativa*, Shoot regeneration, Peroxidase, Isozymes, Isoelectric focusing electrophoresis.

前言

植株再生系統之建立是植物基因轉殖成功與否的重要關鍵之一，尤其是被認為再生較困難的禾本科與豆科作物(Tran Thanh Van 1981)。由於不同品種或品系植株再生能力有顯著差異，為提高基因轉殖效率，材料選擇實為要務之一(Huang *et al.* 2002, Toonen and De Vries 1996, Tran Thanh

Van 1981)。近年來學者們針對培養細胞植株再生能力開發可信度高的篩選指標，期望縮短品種篩選時程。作者曾發現分化初期高葡萄糖含量為水稻癒合組織植株再生重要因子(Huang and Liu 2002)，也曾發現特定蛋白質分子與水稻芽體形成有關(Huang and Liu 1999)，兩者可作為水稻再生能力初步篩選生理指標。另外，Thorpe *et al.* (1978)發現過氧化酵素(peroxidase, POD)與菸草癒合組織器官形成有關，進一步發現特定的POD同功酵素可作為細胞分化的指標(Thorpe and Gaspar 1978, Kay and Basile 1987)，在白楊(Wolter and Gordon 1975)、蘋果(Berger *et al.* 1985)、胡蘿蔔(Cordewener *et al.* 1991, Joersbo *et al.* 1989)、棉花(Mellon 1991)、*Linum usitatissimum* (McDougall *et al.* 1992)、*Phoenix dactylifera* (El Hadrami and Baaziz 1995)、*Zinnia* (Sato *et al.* 1995)、草莓(Tian *et al.* 2003)等也有類似報導。本研究即擬針對POD，探討其是否可作為水稻癒合組織植株再生的標誌酵素。

POD普遍存在植物體中，具許多同功酵素(isozymes)，可區分為可溶性(soluble form)、與細胞壁結合者(wall-bound form)及分泌到細胞外(extracellular form)共三大類，隨不同發育時期、環境條件，在不同部位可能就有不同POD表現(Passardi *et al.* 2004)。一般認為POD可能與植物的生長、老化、木質化(lignification)、生長素代謝及各種逆境的抗性有關(Fang and Kao 2000, Lee and Lin 1995, Lin and Kao 2005, Passardi *et al.* 2004, Sharma and Dubey 2004, Tang *et al.* 2004, Tian *et al.* 2003, Yi and Lee 2003)。近來由於生物技術的快速發展，有愈來愈多研究指出POD也在植物的生長與分化上扮演重要角色，然而不同物種間，POD表現常無一致性，必須依各物種狀況探討之。許多研究顯示植株再生時，POD活性或其同功酵素有變化，但活性究竟增加或減少則無一致的結論，且POD真正的作用為何亦不清楚。

雖然已有許多關於POD同功酵素可作為植株再生指標之報導，惟各培養系統多數以水平式或垂直式澱粉電泳(slab or vertical starch gel electrophoresis)或以原式蛋白質電泳分析(native polyacrylamide gel electrophoresis, native-PAGE)進行蛋白質分離，再進行POD活性染色，分離的效果有限，因此幾乎都是以手繪模式圖表示，無法真實地呈現結果。Pedersen and Andersen (1993)曾以等電點(isoelectric focusing, IEF)電泳分離大麥蛋白質，不過電泳解析度仍不理想。本研究利用已建立之高濃度滲透壓處理可大幅提高水稻癒合組織植株再生能力培養系統為材料(Huang and Liu 2002)，並克服實驗操作上的困難，以IEF電泳原圖呈現水稻培養細胞POD分析結果，並分析在水稻癒合組織植株再生過程中POD活性變化，以探討POD同功酵素是否可作為水稻植株再生的指標。

材料與方法

一、植物材料與組織培養

本試驗以水稻台南5號(*Oryza sativa* L. cv. Tainan 5, TN5)為材料，挑取授粉後約10-12天的未成熟胚，消毒後分別接種在有、無0.6 M mannitol處理癒合組織誘導培養基(MS基礎培養基中添加10 μM 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, MSD_{10}) 中(Murashige and Skoog 1962)，分別以TN5-M_6與TN5-M_0表示之，於28℃連續光照下培養28天，調查癒合組織鮮重變化。並將14天癒合組織分別移至分化培養基(MS基礎培養基中添加20 μM kinetin與10 μM α-naphthaleneacetic acid)，觀察植株再生情形，並分別於第1、3、5、7、9、11、13、14天取樣、固定，進行各項酵素分析(Huang and Liu 2002, Huang *et al.* 2002)。

二、過氧化酵素(peroxidase; POD)萃取與活性分析

將收集的組織加入5% ampholine (pH 3-10, Pharmacia)於低溫研缽中磨碎後，4℃下離心15分鐘，收集上清液，進行soluble POD酵素活性分析與IEF電泳分析。離心後的沈澱物，先以5 mM Tris-HCl (pH 7.0)含1% Triton X-100之緩衝液清洗一次，另以不含Triton之相同緩衝液再清洗兩次，最後以50 mM Tris-HCl (pH 7.0)含3M NaCl 之緩衝液將沈澱物充分懸浮後，置於4℃冰箱中至少12小時。低溫離心後，收集上清液，進行wall-bound POD活性分析(Huang and Liu 1999, Lee and Lin 1995, Kay and Basile 1987)，由於此樣品含高量離子，經數次透析後，仍無法順利進行IEF電泳分析(資料未列)。

本試驗以分光光度計(U2000, Hitachi)呈色法於波長470 nm下測定POD酵素活性。soluble POD反應液中包含50 mM Tris-HCl (pH 7.0)、21.6 mM guaiacol、9 mM H_2O_2及稀釋的萃取液，最後體積為3 mL，反應從H_2O_2加入開始測定(Fang and Kao 2000, Sato *et al.* 1995)。 Wall-bound POD活性測定如同soluble POD測定方法，惟以100 mM NaH_2PO_4 (pH 5.8)取代Tris-HCl緩衝液(Sato *et al.* 1995)。酵素活性單位以每分鐘每毫克蛋白質為基礎，蛋白質含量測定依據Bradford dye-binding方法(Bradford 1976)，並以小牛血清蛋白為標準液。

三、IEF 電泳分析

於10% acrylamide電泳膠片中含5% ampholine (80% pH 3-6與20% pH 3-10)，以垂直式電泳系統(10 x 8 cm, Hofer)進行酵素分離，每樣品注入20 μg蛋白質。以20 mM NaCl為陰極槽(cathode)緩衝液，10 mM H_3PO_4為陽極槽(anode)緩衝液。膠片在樣品加入前，先以500 volts預跑30分鐘，形成pH梯度。樣品加入後，分別以200、400、600、800、1000 volts進行30分鐘電泳，膠片取出後先以100 mM sodium acetate (pH 4.5)含0.1% benzidine之緩衝液平衡，再加入0.007% H_2O_2呈色，等POD條帶出現後再終止反應(Fang and Kao 2000, Pedersen and Andersen 1993)。

結果與討論

一、癒合組織生長與植株再生

將TN5未成熟胚接種在癒合組織誘導培養基(TN5-M_0)中，隨著培養天數增加，癒合組織鮮重明顯增加(Fig. 1)，四週後平均每個癒合組織鮮重可達100 mg。將其誘導兩週癒合組織移到分化培養基後，約第5天會有綠點形成，但一直到四週後只有少數根形成，幾乎沒有芽體再生。若在癒合組織誘導時添加0.6 M mannitol (TN5-M_6)，癒合組織生長明顯減緩，四週後每個癒合組織鮮重平均約只有20 mg左右(Fig. 1)。若將TN5-M_6癒合組織移到分化培養基後3天即可見到綠點形成，綠點持續擴大，第10天左右於接觸培養基部位開始有芽體形成，四週後植株再生率可達80%，此結果與之前的觀察類似(Huang and Liu 1998, 2002, Huang *et al.* 2002)。滲透壓處理有助於植株再生，許多培養系統中均有類似報導(Brown *et al.* 1979, Ho and Vasil 1983, Lu *et al.* 1983、1984, Wetherell 1984)。上述結果也顯示此培養系統極適合用來探討水稻癒合組織植株再生過程中POD之變化。

二、POD 活性分析

本研究分析水稻癒合組織植株再生過程中soluble與wall-bound POD酵素活性變化，結果顯示在植株再生過程中具高分化能力TN5-M_6癒合組織中，不論是soluble POD或wall-bound POD活性均明顯高於不具分化能力的TN5-M_0 (Fig. 2)，其中TN5-M_6 soluble POD在移到分化培養基後第一天，酵素活性顯著下降，之後直到芽體形成均沒有明顯變化(Fig. 2a)，此酵素活性變化，亦可從同功酵素電泳分析上發現(Fig. 3)。而wall-bound POD活性在植株再生初期顯著提高，之後逐漸下降，在第10天小苗形成後

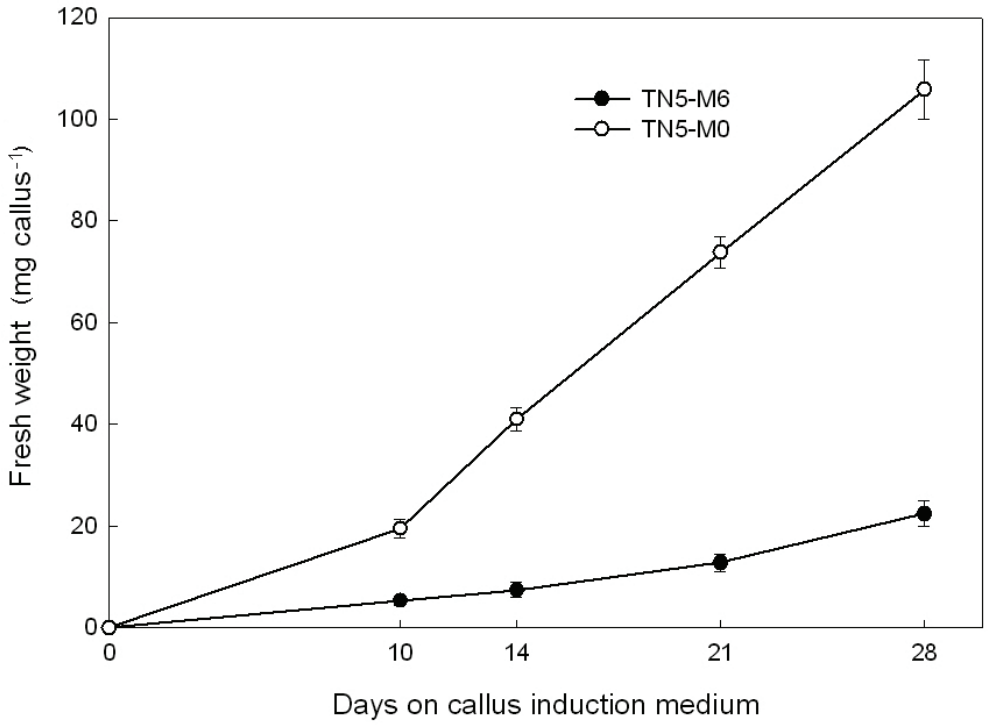

Fig. 1. Changes in the fresh weight of callus derived from TN5 immature embryos inoculated on MSD_{10} medium without （TN5-M_0）or with（TN5-M_6）mannitol treatment. Vertical bars represent standard errors (n = 3). Only those standard bars larger than the symbol are shown.

酵素活性則有再明顯增高趨勢，形成雙高峰曲線(Fig. 2b)。此現象在菸草(Thorpe and Gaspar 1978)、苜蓿(Hurbcova *et al.* 1994)與 *Linum usitatissimum* (McDougall *et al.* 1992)中也有類似結果。El Hadrami and Baaziz (1995) 指出高 POD 活性有利於 *Phoenix dactylifera*體胚形成，在*Hevea brasiliensis* (El Hadrami and d'Auzac 1992)、蒿苣(Zhou *et al.* 1992)、胡蘿蔔(Cordewener *et al.* 1991, Joersbo *et al.* 1989)、苜蓿(Hurbcova *et al.* 1994)、草莓(Tian *et al.* 2003)等都有類似報導。

POD在植株再生過程中扮演的角色雖仍不清楚，一般認為高POD活性可能促進內生生長素分解，導致cytokinin / auxin比例改變，有利於植株再生(El Hadrami and Baaziz 1995, Thorpe *et al.* 1978, Tran Thanh Van 1981)。此外，POD亦被認為與維持細胞壁結構緊密有關(Fry 1986, Kolattukudy *et al.* 1992, Lin and Kao 2005, Tran Thanh Van 1981)。Van Engelen and De Vries (1992)以胡蘿蔔懸浮細胞為材料，從可體胚形成的培養基中純化一38 kD蛋白質，經證實是wall-bound POD，將其添加到受tunicamycin抑制體胚形成的細胞中，可恢復其體胚形成能力，直接証明POD確與植株再生有關。作者推測POD會促使細胞壁木質化，由於木質素累積，在細胞外圍形成一特殊結構，誘導管胞分子(tracheary elements)形成，有利於體胚形成(Cordewener *et al.* 1991, De Jong *et al.* 1992, Van Engelen and De Vries 1992)。

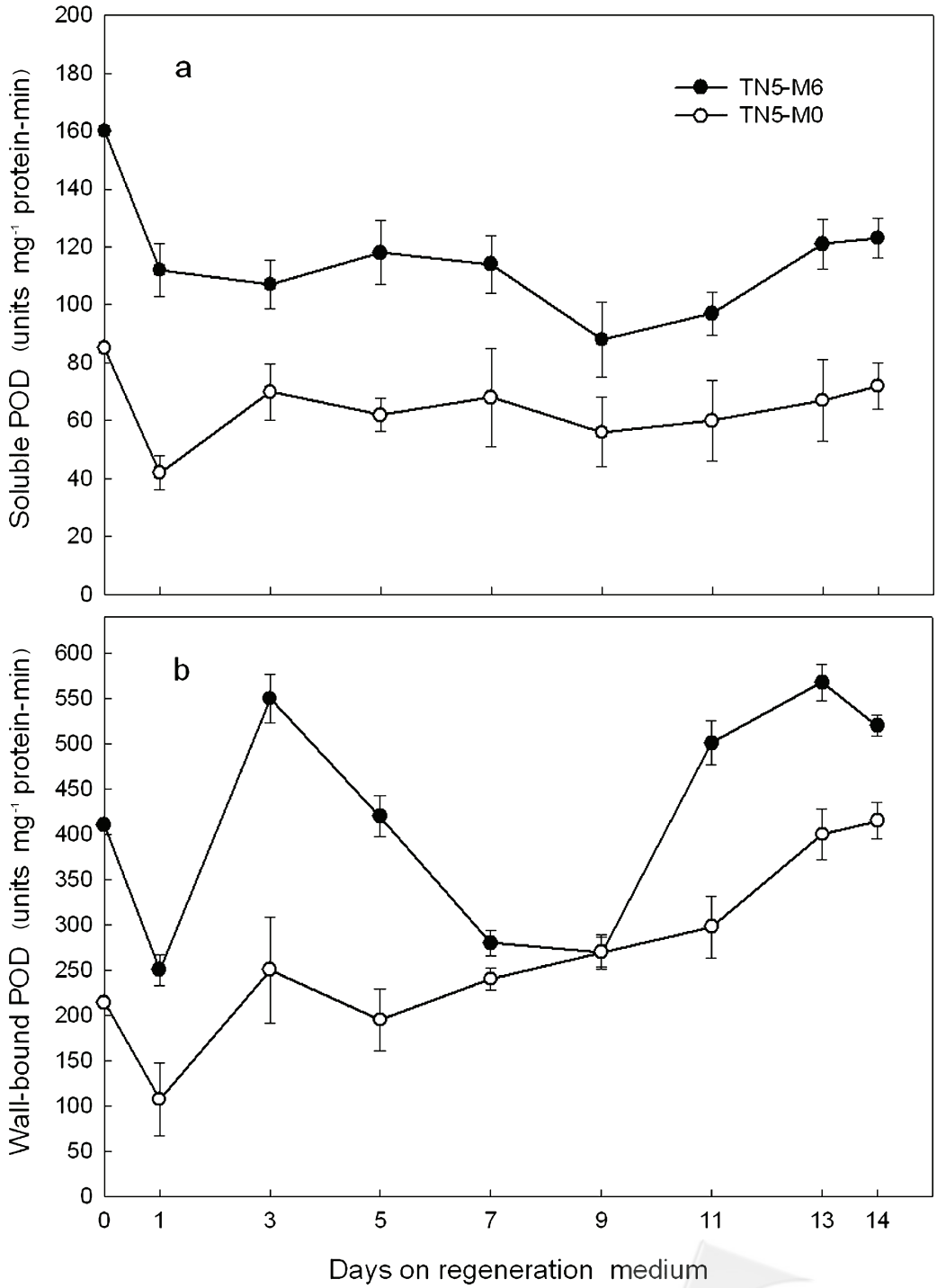

Fig. 2. Changes of soluble (a) and wall-bound (b) peroxidase specific activities in rice callus during shoot regeneration. Day 0 represents the fourteenth-day old callus transferred to regeneration medium. Vertical bars represent standard errors (n = 3).

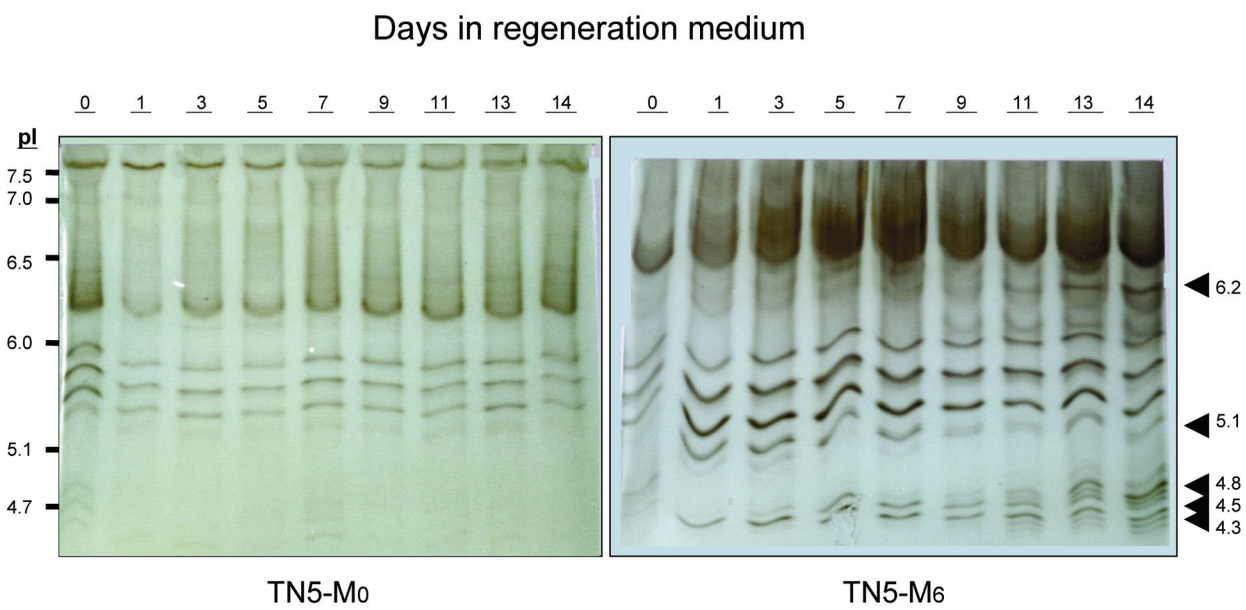

Fig. 3. Expression of soluble peroxidase isozymes in TN5-M_0 (a) and TN5-M_6 (b) callus during shoot regeneration. Peroxidase isozymes were separated by isoelectric focusing electrophoresis. The gel was stained with benzidine-H_2O_2(pH 4.5). The arrows indicate the isozymes expression increased during shoot regeneration. Isozymes described in the right are marked by their isoelectric points.

三、POD 同功酵素分析

本研究利用IEF電泳進行POD同功酵素分析，結果顯示不具分化能力的TN5-M_0在分化培養基中POD同功酵素沒有明顯變化(Fig. 3)，反之，具高分化能力的TN5-M_6癒合組織移到分化培養基後第一天，pI 4.5與pI 5.1的同功酵素即明顯表現(Fig. 4)，5天後隨綠點形成，發現pI 4.7與pI 6.2左右的同功酵素陸續出現，尤其是pI 6.2 POD的表現在植株再生後期愈來愈明顯。而在第10天芽體形成後，在pI 4.3 - 4.8附近的一群同功酵素有慢慢出現的趨勢(Fig. 4)。由於pI 4.5的POD在癒合組織移到分化培養基後第一天即明顯表現，在作者利用矮南早39另一水稻高植株再生率系統中也有類似的結果(Huang and Liu, unpublished data)，而不具分化能力的水稻癒合組織中則無此POD同功酵素表現，顯示pI 4.5的POD同功酵素極適合作為水稻癒合組織植株再生的標誌酵素，值得進一步研究。雖然pI 4.7與pI 6.2的同功酵素也有明顯表現，惟其出現的時間較晚且與芽體形成時間相近，似乎較不適合作為植株再生的指標。Wolter and Gordon(1975)首先指出特定的POD同功酵素可作為白楊細胞分化的指標，類似的結果也在菸草(Thorpe and Gaspar 1978, Kay and Basile 1987)、蘋果(Berger *et al.* 1985)、胡蘿蔔(Cordewener *et al.* 1991, Joersbo *et al.* 1989)、棉花(Mellon 1991)、*Linum usitatissimum*(McDougall *et al.* 1992)、*Phoenix dactylifera*(El Hadrami and Baaziz 1995)、*Zinnia*(Sato *et al.* 1995)、草莓(Tian *et al.* 2003)中發現，顯示POD同功酵素確可作為培養細胞植株再生標誌酵素。

由上述敘述可知，雖然POD同功酵素可作為植株再生標誌酵素的研究已有許多成功例子，惟上述例子幾乎都是利用澱粉電泳或

是原式蛋白質電泳(native-PAGE)進行蛋白質分離，再進行POD活性染色，且都是以模式圖呈現結果。本研究曾利用native-PAGE進行相關分析，無法有效分離水稻培養細胞內蛋白質(資料未列)，進一步利用IEF等電點電泳進行水稻癒合組織POD同功酵素分析，獲得十分顯著結果，此技術應可應用於不同物種分析上，實為一大突破。

誌謝

本研究承蒙行政院國家科學委員會與農業委員會經費補助，謹致謝意。

引用文獻

Berger RG, F Drawert, A Kinzkofer, C Kunz, BJ Radola (1985) Proteins and peroxidase in callus and suspension cultures of apple. **Plant Physiol.** 77: 211-214.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the determination of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-254.

Brown DCW, DWM Leung, TA Thorpe (1979) Osmotic requirement for shoot formation in tobacco callus. **Physiol. Plant.** 46: 36-41.

Cordewener J, H Booij, H Van Der Zandt, FA Van Engelen, AV Van Kammen, SC De Vries (1991) Tunicamycin-inhibited carrot somatic embryogenesis can be restored by secreted cationic peroxidase isoenzymes. **Planta** 184: 478-486.

De Jong BJ, J Cordewener, F Lo Schiavo, M Terzi, J Vandekerckhove, AV Van Kammen, SC De Vries (1992) A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. **Plant Cell** 4: 425-433.

El Hadrami I, J d'Auzac (1992) Effects of growth regulators on polyamine content and peroxidase activity in *Hevea brasiliensis* callus. **Ann. Bot.** 69: 323-325.

El Hadrami I, M Baaziz (1995) Somatic embryogenesis and analysis of peroxidases in *Phoenix dactylifera* L. **Biol. Plant.** 37: 197-203.

Fang WC, CH Kao (2000) Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to excess iron, copper and zinc. **Plant Sci.** 158: 71-76.

Fry SC (1986) Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. **Ann. Rev. Plant Physiol.** 37: 165-186.

Ho WJ, IK Vasile (1983) Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.): Growth and plant regeneration from embryogenic cell suspension cultures. **Ann. Bot.** 51: 719-726.

Hrubcova M, M Cvikrova, J Eder (1994) Peroxidase activities and contents of phenolic acids in embryogenic and nonembryogenic alfalfa cell suspension cultures. **Biol. Plant.** 36: 175-182.

Huang WL, LF Liu (1999) Changes of protein patterns during rice (*Oryza sativa* L.) callus induction and shoot regeneration induced by high concentration of sucrose. **Chinese Agron. J.** 9: 221-231.

Huang WL, LF Liu (2002) Carbohydrate metabolism in rice during callus induction and shoot regeneration induced by osmotic stress. **Bot. Bull. Acad. Sin.** 43: 107-113.

Huang WL, YC Tsung, LF Liu (2002) Osmotic stress promotes shoot regeneration in immature embryo-derived callus in rice (*Oryza sativa L.*). **J. Agric. Assoc. China.** 3(1): 76-86.

Joersbo M, JM Andersen, FT Okkels, R Rajagopal (1989) Isoperoxidases as markers of somatic embryogenesis in carrot cell suspension cultures. **Physiol. Plant.** 76: 10-16.

Kay LE, DV Basile (1987) Specific peroxidase isoenzymes are correlated with organogenesis. **Plant Physiol.** 94: 99-105.

Kolattukudy PE, R Mohan, BM Aslam, BA Sherf (1992) Plant peroxidase gene expression and function. **Biochem. Soc. Trans.** 20: 333-337.

Lee TM, YH Lin (1995) Changes in soluble and cell wall-bound peroxidase activities with growth in anoxia-treated rice (*Oryza sativa* L.) coleoptiles and roots. **Plant Sci.** 106: 1-7.

Lin YC, CH Kao (2005) Nickel toxicity of rice seedlings: Cell wall peroxidase, lignin, and $NiSO_4$-inhibited root growth. **Crop, Environ. & Bioinfo.** 2: 131-136.

Lu CY, V Vasile, IK Vasile (1983) Improved efficiency of somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue culture of maize (*Zea mays* L.). **Theor. Appl. Genet.** 66: 285-289.

Lu CY, SF Chandler, IK Vasile (1984) Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured immature embryos of rye (*Secale cereale* L.). **J. Plant Physiol.** 115: 237-244.

McDougall GJ, D Davidson, S Millam (1992) Alterations in surface-associated peroxidases during callus development and shoot formation in explants of *Linum usitatissimum*. **J. Plant Physiol.** 140: 195-200.

Mellon JE (1991) Purification and characterization of isoperoxidases elicited by *Aspergillus flavus* in cotton ovule cultures. **Plant Physiol.** 95: 14-20.

Murashige T, F Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiol. Plant.** 15: 473-479.

Passardi F, D Longet, C Penel, C Dunand (2004) The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. **Phytochemistry** 65: 1879-1893.

Pedersen S, SB Andersen (1993) Developmental expression of isozymes during embryogenesis in barley anther culture. **Plant Sci.** 91: 75-86.

Sato Y, M Sugiyama, A Komamine, H Fukuda (1995) Separation and characterization of the isoenzymes of wall-bound peroxidases from cultured *Zinnia* cells during tracheary element differentiation. **Planta** 196: 141-147.

Sharma P, RS Dubey (2004) Ascorbate peroxidase from rice seedling: properties of enzyme isoforms, effects of stresses and protective roles of osmolytes. **Plant Sci.** 167: 541-550.

Tang W, LC Harris, V Outhavong, RJ Newton (2004) Antioxidants enhance in vitro plant regeneration by inhibiting the accumulation of peroxidase in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). **Plant Cell Rep.** 22: 871-877.

Thorpe TA, M Tran Thanh Van, T Gaspar (1978) Isoperoxidases in epidermal layers of tobacco and changes during organ formation in vitro. **Physiol. Plant.** 44: 388-394.

Thorpe TA, T Gaspar (1978) Change in isoperoxidases during shoot formation in tobacco callus. **In Vitro** 14: 522-526.

Tian M, Q Gu, M Zhu (2003) The involvement of hydrogen peroxide and antioxidant enzymes in the process of shoot organogenesis of strawberry callus. **Plant Sci.** 165: 701-707.

Toonen MAJ, SC De Vries (1996) Initiation of somatic embryos from single cells. p.173-190. *In:* Embryogenesis, the generation of a plant. TL Wang, A Cuming (Eds.) BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK.

Tran Thanh Van M (1981) Controls of morphogenesis in in vitro cultures. **Ann. Rev. Plant Physiol.** 32: 291-311.

Van Engelen FA, SC De Vries (1992) Extracellular proteins in plant embryogenesis. **Trends in Genet.** 8(2): 66-70.

Wetherell DF (1984) Enhanced adventive embryogenesis resulting from plasmolysis of cultured wild carrot cells. **Plant Cell Tissue Org. Cult.** 3: 221-227.

Wolter KE, JC Gordon (1975) Peroxidases as indicators of growth and differentiation in aspen callus cultures. **Physiol. Plant.** 33: 219-223.

Yi KW, MY Lee (2003) Environmental stress-induced extracellular isoperoxidase RC3 from rice. **J. Environ. Biol.** 24: 17-22.

Zhou X, Y Han, W Yang, T Xi (1992) Somatic embryogenesis and analysis of peroxidase in cultured lettuce (*Lactuca sativa* L.) cotyledons. **Ann. Bot.** 69: 97-100.

－編輯：謝兆樞