

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

蔗糖合成酶與水稻發育的關係

The Role of Sucrose Synthase for Rice Development

計畫編號：NSC 89-2313-B-002-189

執行期限：89年8月1日至90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葉片、穗軸與充實中穀粒內蔗糖合成酶(Sucrose synthase, SS)之表現，結果發現蔗糖合成酶主要表現於葉肉細胞、穗軸的同化組織、輸導組織、及穀粒糊粉層、胚乳與種皮的輸導組織等組織，其表現位置與同化物質之轉運密切相關，但對不同組織內澱粉累積的作用不同。此外，20°C處理下各組織內蔗糖合成酶之表現較少，穗軸明顯變細，且基礎組織內累積許多澱粉無法轉運，可能是穀粒無法充實的原因，25°C與30°C處理則無明顯差異。

關鍵詞：水稻、澱粉、蔗糖合成酶、免疫組織化學法。

Abstract

The distributions of rice sucrose synthase (SS) in rice leave, panicle axis, and grain were studied by immunohistochemical method. The results showed SS was mainly localized in the transport tissue and mesophyll in leaf, catabolic tissue and transport tissue in panicle axis, aleurone layer, endosperm and transport tissue in grain. It showed that SS localization is correlated with metabolites transportation. Under 20°C, lower SS was found in issues of plants. Panicle axis showed smaller diameter and lots of starch in the ground tissue. It may be

the reason that grain-filling was reduced under 20°C. No significant difference was found between 25°C and 30°C.

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; Umemoto, *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(Crepsi, *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，及其與穀粒發育的關係。

三、結果與討論

本試驗以水稻台梗 9 號為材料，於水稻抽穗開花時，將稻株移至 20°C、25°C 與 30°C 處理，在受粉後十天左右，採取劍葉、穗軸、充實中穀粒等，經固定、脫水、滲腊、包埋、切片等處理後，以 SS 的單株抗體（抗體由本校農化系王愛玉教授提供）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，以光學顯微鏡觀察。將不同溫度處理的組織切片黏貼在同一玻璃片上，同時進行免疫反應，以避免誤差。

結果發現葉片中 SS 主要表現於葉肉

細胞及輸導組織，三種溫度處理間葉片形態無明顯差異，但 20°C 處理下 SS 表現較少，25°C 與 30°C 處理間差異不大。

穗軸中 SS 主要表現於輸導組織及位在周邊的同化組織，穗軸的生長與發育，與溫度的關係密切，20°C 處理下，穗軸明顯變細，同化組織間區隔不清楚，SS 的表現較弱，且基礎組織內累積許多澱粉，但並沒有 SS 的表現。隨溫度增加，穗軸逐漸增粗，基礎組織內幾乎沒有澱粉，也沒有 SS 的表現。

在充實中的穀粒，SS 表現於糊粉層、胚乳及種皮的輸導組織等，20°C 處理下，穀粒充實速度減慢且不飽滿，SS 表現較弱，隨溫度增加，穀粒愈趨飽滿，SS 表現增強。

以上結果顯示，SS 表現位置主要在輸導組織，特別是韌皮部，推測應與同化物質之轉運有關。在玉米及柑橘葉片中亦得到同樣結果(Nolte & Koch, 1993)，其功能可能是提供蔗糖轉運能量及蔗糖代謝之基質 UDPG。此外，胚乳中累積澱粉多的細胞內也有大量 SS 表現，而穗軸基礎組織內雖然累積許多澱粉，但並沒有 SS 的表現，顯示 SS 對不同組織內澱粉累積的作用不同。低溫下穗軸的變化，可能是穀粒無法充實的原因，但其澱粉為何無法轉運，值得進一步探討。

本試驗中 25°C 與 30°C 處理間各種差異較小，可能因為這兩個溫度都是水稻生長的適溫，而且於水稻抽穗開花時才進行處理，各部分組織發育已經完成，不易顯示差別，以後可再提高溫度，並提早處理時間。

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。藉由觀察不同溫度處理下酵素的變化，將有助於解答實際栽培上所發生的問題，並

提供改善的可行方向。此外，SS 在水稻中有三種同功酵素，目前本校農化系王愛玉教授正在製造個別專一的免疫抗體，未來將可進一步區別三種同功酵素的表現與作用。

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.