

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

轉殖海藻糖合成酶基因改善水稻對乾旱的適應力〔2/3〕

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2313-B-002-323-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：國立臺灣大學農藝學系暨研究所

計畫主持人：劉麗飛

計畫參與人員：趙雲洋

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 5 月 29 日

轉殖海藻糖合成？基因改善水稻對乾旱的適應力

Enhancement of draught tolerant in transgenic rice with a trehalose sythase gene

計畫編號：NSC 91 -2313-B-002-323-

執行期限：91 年 8 月 1 日至 92 年 7 月 31 日

主 持 人： 劉麗飛 國立台灣大學農藝系

計畫參與人員：趙雲洋 國立台灣大學農藝系

中文摘要

本計畫是轉殖 TPS(海藻糖合成？) 基因於水稻優良品種台6農號(TNG67)或台梗9號(TK9)，並在後代中選育出對乾旱有較強忍受力的水稻。計畫執行至目前已獲得三種方式調控的轉殖水稻，這些轉殖水稻大部分為1~2個拷貝，並且可轉錄成 mRNA。TPS 蛋白可在體外大量表現，經純化後製成抗體可進行西方墨點分析。轉殖水稻在逆境下的表現，初步瞭解可耐鹽，目前在進行乾旱測試，希望在利用已建立的耐旱篩選方法中，能獲得耐性較強的植株。

關鍵詞：海藻糖，海藻糖合成酵素，基因轉殖，水稻

Abstract

In this project, the *TPS* gene will be transferred to rice (TNG 67 or TK 9) by Agro-infection methods. We will select the high tolerance of draught in transgenic progeny.

Now we obtained transgenic plants that constitutive or stress-inducible promoters drove the *TPS* gene. The transgenic lines contained a low copy number of trans-

gene that achieved transcription by northern-bolt. The TPS protein was overexpressin in *E.coli.*, therefore will proceed western blot after TPS protein being purified. Our data show the transgenic rice are salt tolerant. The draught tolerant plant will be found as soon as possible.

Keywords: Trehalose, TPS, gene , transfer, Rice.

二、緣由與目的

全球性氣候變遷，使作物生存環境日漸惡化，在生長過程中必須遭遇更多逆境與壓力。氣候變遷除了造成地球昇溫以外，更造成水分供應失調，許多地區沙漠化日益嚴重。Allen and Breshears (1998) 指出在未來十年間，缺水將使作物無法生長，栽培面積減少，造成糧食不足而無法因應眾多人口的需求。水稻為重要的三大穀類糧食作物之一，在栽培時需水量大，若能增加耐旱能力，則可減少用水，一方面有環境保育的意義，另一方面可擴展水稻的栽培地區。植物耐旱的機制很多，例如改變植株形態或結構，以減少水分散失；或形成滲透保護物質(osmoprotactant)，如：

mannitol 或 sorbitol 等糖醇類，betaine、proline、trehalose、fructan 及多元胺等。

此外缺水逆境下亦會產生一些特殊的蛋白質分子，例如 LEA 蛋白質(Late embryogenesis protein)等。這些物質的特徵是具有高度的水溶性、不攜帶電價、可維持生理作用時的 pH 值，並且大量累積時對細胞不會造成毒害，其作用不但可以維持細胞質內的滲透壓，亦可穩定細胞內蛋白質與膜係的結構。在水稻方面陸續有相關的報導，目前已經轉殖有 *p5cs* 基因(Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthase)提高 proline 含量；轉殖 *Adc* 基因(arginine decarboxylase)提高二元胺 putrescine 含量；及轉殖 *HVA1* 基因(第二群 LEA 蛋白質基因)，結果均可促進水稻對缺水或鹽害的耐性。本計畫即擬探討以基因轉殖方法增加水稻中 trehalose 含量以提高水稻耐旱能力。

Trehalose (α -D-glucopyranosyl α -glucopyranoside) 為海藻糖，普遍存在動植物體中，在體內代謝的方式與蔗糖相似，trehalose 是由 2 個葡萄糖經由海藻糖合成？ trehalose-6-phosphate synthase (TPS) 作用形成 trehalose-6-phosphate 後，再經由海藻糖磷酸激 trehalose 6-phosphate phosphatase (TPP) 催化後而合成，同時可藉由 trehalase 水解成葡萄糖，因此 TPS、TPP 和 trehalase 等酵素活性與 trehalose 的含量有絕對的關係，大量表現 TPS 與 TPP 活性或抑制 trehalase 活性均可增加作物體中 trehalose 含量。目前已從大腸桿菌、酵母菌、阿拉伯芥和馬式捲柏選殖出 TPS 與 TPP 基因。

研究者進一步利用基因轉殖技術將大腸桿菌中 *ots A* (為 TPS) 和 *otsB* (為 TPP)

基因轉殖於菸草中，在 T_0 代分析得知，*ots A ots B* 與 *ots A* 轉植株中 trehalose 含量相似，由此可知 TPS 是調控 trehalose 含量的主要酵素。在水稻方面目前尚無相關之轉殖研究，但 Garcia .et al.(1999) 在高鹽環境下比較水稻外加 trehalose 與 proline 的保護效果，發現施用 trehalose 後水稻葉綠素含量及鹽分排出體外的能力均比施用 proline 來的高。顯示 trehalose 保護水稻細胞的效果比 proline 佳。因此若能將合成 trehalose 的酵素基因轉殖到水稻中，直接提高 trehalose 含量，推測應可有助於水稻對乾旱的耐性，甚至可能應用於耐鹽。

本計畫擬轉殖的 TPS 基因係來自於美國華盛頓大學賀端華教授，沒有專利的問題，基因的驅動採用大量表現與可誘導式啟動子(inducible promoter)，並比較二者之間的差異及影響，質體構築完成後，用農桿菌轉殖法轉殖於水稻優良品種台農 67 號(TNG67)或台梗 9 號(TK9)，藉由不同程度乾旱處理，希望能培育出不影響正常生長且具耐旱能力的水稻，以減少水稻栽培時的用水量，未來並可提供其他學者做為耐鹽性探討之材料。由於水稻方面目前尚無不論國內、外均為創新性之研發。

三、結果與討論

本計畫執行至今，已完成轉殖質體的構築，獲得 T_0 轉殖植株及部分植株鑑定。

在質體構築方面已完成三個轉殖質體。分別為：

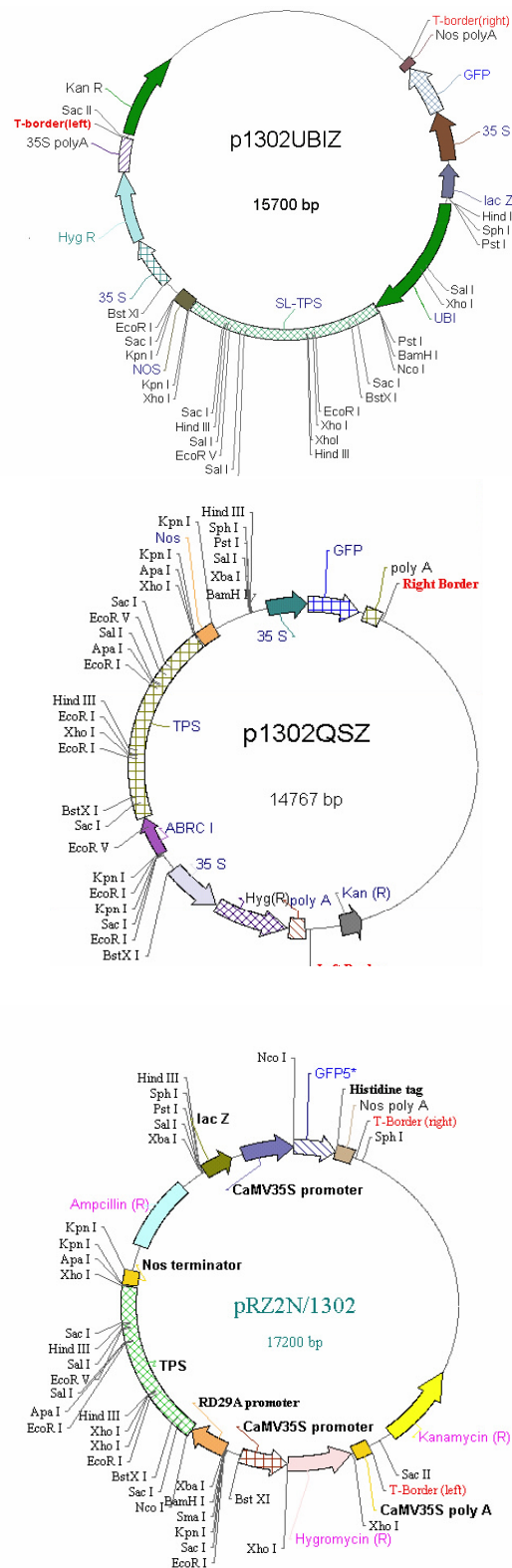
1. 啟動子為 Ubiquitin，可廣泛性調節基因表現，稱 **p1302UBIZ**，全長為 15700bp。(圖一)
2. 啟動子為 RD29A，可受乾旱誘導而調節基因表現，稱 **p1302RZN**，全長為 17200bp。(圖一)
3. 啟動子為 ABRC，可受 ABA 誘導而調節基因表現，稱 **p1302QSZ**，全長為 14767bp。(圖一)

利用農桿菌轉殖法，將已構築好的質體轉殖於水稻中。目前已經進行多次轉殖，其中二次轉殖比較成功，經培養篩選及植物再生後，分別均得到 T₀ 轉殖植株，其轉殖效率達 1.7%~5.2% (表一)。

目前總計已得到 T₀ 轉殖水稻 50 株，其中 9 株為空白質體 p1302，42 株為含 TPS 基因之轉殖株，在人工氣候室以盆栽方式栽培，目視觀察生長狀況大致正常，株高、分蘗、株型、葉型等均與未轉殖植株相似，但稔實率卻比未轉殖植株低。

T₀ 植株種植於人工氣候室中，取葉片抽取 DNA，以南方氏墨點法進行檢定，並判別 TPS 轉殖基因拷貝數，目前已完成部分轉殖植株檢測，發現大多數轉殖株含有 1~2 個拷貝。

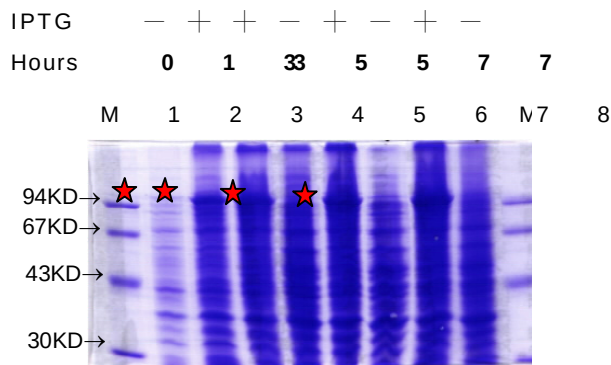
另外構築完成體外表現 TPS 蛋白之質體 (pETRZ)，並將含 pETRZ 質體的大腸桿菌，經培養及誘導後可得到 109KD 的 TPS 蛋白質 (圖二)。此蛋白可純化後製成抗體，以利進行西方墨點分析(western analysis)。



圖一、三種轉殖質體圖譜

表一 水稻轉殖TPS基因之篩選結果

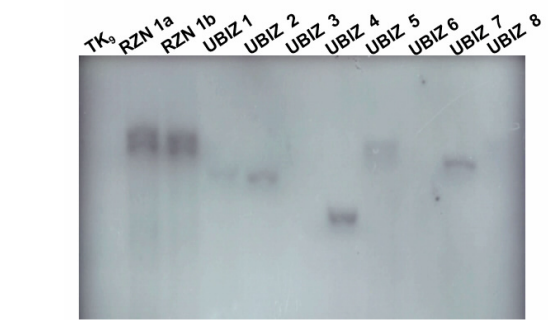
質體名稱	感染癒合 組織數目	可抗 Hyg 的癒 合組織數目	轉殖系 的數目	轉殖植株 的數目	^a 轉殖效率(%)	平均(%)
p1302 (Vector)	188	98	9	9	4.7% (9 / 188)	4.7 %
p1302 RZN (promoter:RD29A)	364	208	10	17	2.7% (10 / 364)	2.7 %
p1302 QSZ (promoter:ABRC)	524	421	9	10	1.7 % (9 / 524)	1.7 %
p1302 UBIZ (promoter:Ubiquitin)	134	120	9	14	6.7 % (9 / 134)	5.2 %
	214	102	8	8	3.7 % (8 / 214)	



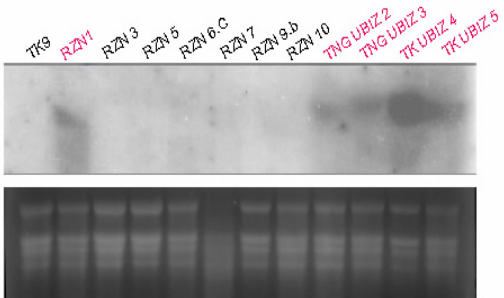
★表示 TPS 蛋白表現位置

圖二. TPS 蛋白質大量表現

轉殖植株T₀ 代種植於人工氣候室中，取葉片抽取 DNA，進行檢定並判別 TPS 轉殖基因拷貝數。目前已完成轉殖植株中部分檢測，發現 RZN 1 等植株為2個拷貝，其他數轉殖株均為1個拷貝（圖三）。由北方式墨點式分析 TPS 轉殖植株得知，UBIZ 轉殖植株在未處理時RNA的表現比 RZN 轉殖植株好（圖四）。



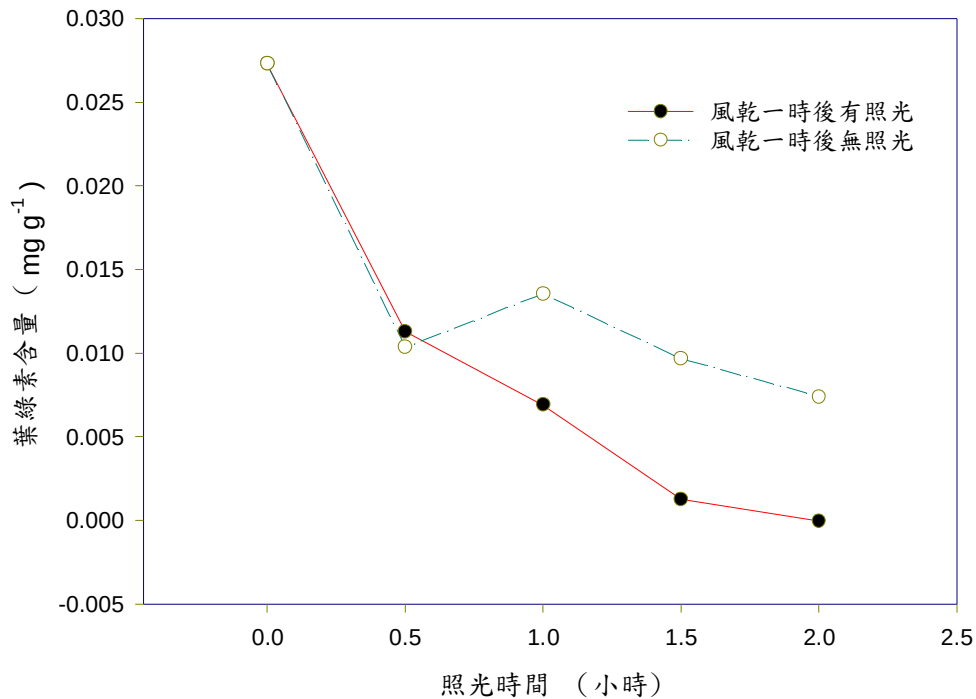
圖三.南方式墨點分析含 TPS轉殖植株



圖四.北方式墨點分析 TPS轉殖植株

從轉殖植株耐鹽性測試得知，種子直接浸150mM的鹽水3天後，再種於不含鹽的固態洋菜膠上，經一星期後，轉殖株較耐鹽，地上部與地下部的生長均比對照組好（圖五）。

水稻耐旱性測試



圖六. 非轉殖水稻耐旱性之預備測試



圖五. 轉殖植株耐鹽性測試。TK9為對照組，U2-11-14為轉殖水稻

而對照組植株耐旱性測試得知，在風乾 1 小時後再照光 1 小時，葉綠素含量則明顯減少，若持續照光 2 小時，葉綠素含量則趨近餘零（圖六）。因此可以依此條件當作篩選耐旱的方法。

四、計畫成果自評

本計畫依照進度進行，至目前獲得可受不同方式調控的轉殖水稻，並證明轉殖水稻大部分為 1~2 個拷貝，植株內轉殖基因在 RNA 層次亦有表現。TPS 蛋白順利在體外表現，將此蛋白純化製成抗體後可進行西方式分析。轉殖水稻初步瞭解可耐鹽，但仍可進一步由分生層面，瞭解轉殖水稻在高鹽下的變化。耐旱篩選方法已建立，希望亦可獲得對乾旱耐性較強的植株。

五、参考文献

1. Bajaj, S., Targolli, J., Liu, L.F., Ho, T.H.D., and Wu, R. (1999) Transgenic approaches to increase dehydration-stress tolerance in plants. *Molecular Breeding* 5: 493-503.
2. Bassie L, Noury M, Leprieu O, Lahaye T, Christou P, and Capell T. (2000) Promoter strength influences polyamine metabolism and morphogenic capacity in transgenic rice tissues expressing the oat *adc* cDNA constitutively. *Transgenic Res* 9: 33-42.
3. Bray, E.A. (1997) Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Sci* 2:48-54.
4. Capell, T., Escobar, C., Liu, H., Burtin, D., Leprieu, O., and Christou, P. (1998) Overexpression of the oat decarboxylase cDNA in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) affects normal development patterns *in vitro* and results in putrescine accumulation in transgenic plants. *Theor Appl Genet* 97: 246-254.
5. Cruz, R.T., and O'Toole, J.C. (1984) Dryland rice response to an irrigation gradient at flowering stage. *Agron J* 76:178-187.
6. Ekanayake, I. J., O'Toole, J. C., De Datta, S.K., and Stoponkus, P.L. (1989) Spikelet sterility and flowering response of rice to water stress at anthesis. *Annals of Botany* 63:257-264.
7. Ekanayake, I. J., O'Toole, J. C., De Datta, S.K., and Stoponkus, P.L. (1993) Effect of water deficit stress on diffusive resistance, transpiration, and spikelet desiccation of rice (*Oryza sativa* L.). *Annals of Botany* 72:73 – 80.
8. Ekanayake, I. J., O'Toole, J. C., De Datta, S.K., and Stoponkus, P.L. (1990) Sensitivity of pollen to water deficits at anthesis in upland rice. *Crop Sci* 30:310-315.
9. Garcia, A.B., Engler, J.A., Iyer, S., Gerats, T., Montagu, M.V., and Caplan, A.B. (1999) Effects of osmoprotectants upon NaCl stress in rice. *Plant Physiol.* 115:159-169.
10. Goddijn, O.J.M., Theo, C., Verwoerd, E.V., Ronny W.H.H.K., Peggy, T.H.M., Juul, P., Kees, V.D., Anne, S.P., Brigitte, D. and Jan. P. (1997) Inhibition of trehalase activity enhance trehalose accumulation in transgenic plants. *Plant Physiol* 113:181-190.
11. Goddijn, O.J.M. and Dun, K. (1999) Trehalose metabolism in plants *Trends in Plant Sci* 4: 313-319.
12. Holmberg, N., and Bulow N. (1998) Improving stress tolerance in plants by gene transfer. *Trends in Plant Sci* 3:61-66.
13. Igarashi, Y., Yoshida, Y., Sanada, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Wada K., and Shinozaki, K. (1997) Characterization of the gene for delta-pyrroline-5-carboxylate synthetase and correlation between the expression of the gene and salt tolerance in *Oryza sativa* L. *Plant Mol Biol* 33(5): 857-865.
14. Muller, J., Boller, T., and Wiemken, A. (1995) Trehalose and trehalase in plants: Recent developments. *Plant Sci* 112: 49.
15. Muller, J., Wiemken, A., and Aeschbacher, R. (1999) Trehalose metabolism in sugar sensing and plant development. *Plant Sci* 147: 37-47.