

國立臺灣大學生物資源暨農學院農藝學系

博士論文

Department of Agronomy

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Doctoral Dissertation

水稻葉鞘在抽穗期間由儲存組織轉換成供源組織之

分子調控機制

Molecular regulation of sink-source transition in rice leaf
sheaths during the heading period

陳懷如

Huai-Ju Chen

指導教授：王淑珍 博士

Advisor : Shu-Jen Wang, Ph. D.

中華民國九十八年七月

July, 2009

目 錄

目錄.....	1
圖表與附錄目錄.....	3
縮寫字對照表.....	5
中文摘要.....	7
英文摘要.....	8
前言	
1. 水稻葉鞘於抽穗前後期所扮演之角色.....	10
2. 葉片儲存-供源轉換之相關研究.....	11
3. 水稻澱粉合成之相關基因.....	12
4. 水稻澱粉分解之相關基因.....	14
5. 澱粉代謝相關基因之影響因子.....	15
6. 水稻蔗糖轉運蛋白基因之相關研究.....	16
7. 本論文之試驗架構及意義.....	18
材料與方法	
1. 植物材料、種植與處理方法.....	20
2. 醣類定性與定量分析.....	21
3. 基因表現分析.....	23
4. Microarray 分析.....	24
5. 蛋白質萃取、定量與酵素活性分析.....	25
6. ABA 萃取與含量分析.....	30
7. 啟動子鈎取及序列分析.....	32
8. 以暫時性表現系統進行啟動子活性分析.....	33
9. Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA)	37
10. 以穩定性表現系統進行啟動子活性分析.....	41
11. 統計分析.....	44
結果	
1. 葉鞘中澱粉合成、澱粉分解與蔗糖轉運蛋白基因於抽穗期間之表現.....	45
1.1. 水稻上位葉葉鞘在抽穗期間其澱粉與可溶性醣類含量變化.....	45
1.2. 移除幼穗之水稻其葉鞘澱粉含量於抽穗期間之變化.....	45
1.3. 澱粉合成相關基因在葉鞘儲存-供源轉變期間之表現.....	46

1.4. α -amylase, β -amylase 及 <i>OsSUTs</i> 基因於葉鞘儲存-供源轉變期間之表現..	47
2. 以 Microarray 分析儲存期及供源期葉鞘中之基因表現.....	47
3. 探討荷爾蒙是否為調控葉鞘儲存-供源轉換之內在因子.....	49
3.1. 澱粉合成基因啟動子分析.....	49
3.2. 荷爾蒙傳導相關轉錄因子- <i>OsDOF3</i> 與 <i>OsWRKY71</i> 在葉鞘中於抽穗期間 之表現分析.....	50
3.3. 植物荷爾蒙對切離葉鞘中澱粉含量的影響.....	50
3.4. 植物荷爾蒙 ABA 對切離葉鞘中澱粉代謝相關酵素活性及 <i>OsSUTs</i> 基因表 現的影響.....	51
3.5. 抽穗期間水稻葉鞘中內生 ABA 含量與澱粉分解酵素活性變化.....	52
4. 探討水稻葉鞘於儲存-供源轉換時,調控 <i>OsSUT</i> 基因表現之訊息因子.....	52
4.1. 台農 67 水稻之 <i>OsSUT1</i> 、2、4 基因之啟動子分子分析.....	52
4.2. <i>OsSUT1</i> 、2 及 4 基因啟動子於葉鞘中的暫時性表現分析.....	53
4.3. <i>OsSUT4</i> 基因不同長度啟動子片段之暫時性表現分析.....	55
4.4. <i>OsSUT4</i> 基因之 DF(-550/-484)與 DF(-643/-603)啟動子片段進行 EMSA 分 析.....	56
4.5. <i>OsSUT4</i> 基因不同長度啟動子之穩定性表現分析.....	57
討論	
1. 水稻 TNG67 之-2 葉鞘為抽穗期間主要澱粉儲存組織.....	59
2. 稻穗的抽出及其碳源需求調控抽穗後時期葉鞘的供源能力.....	59
3. 水稻葉鞘儲存-供源轉變之標識基因.....	60
4. 影響葉鞘中澱粉代謝的內在因子.....	63
5. 影響葉鞘中蔗糖轉運蛋白表現的內在因子.....	66
6. 調控葉鞘中 <i>OsSUT4</i> 在抽穗後大量表現的啟動子區域.....	68
7. 葉鞘組織暫時性表現系統之建立.....	70
8. 結語與未來展望.....	70
參考資料.....	72

圖表與附錄目錄

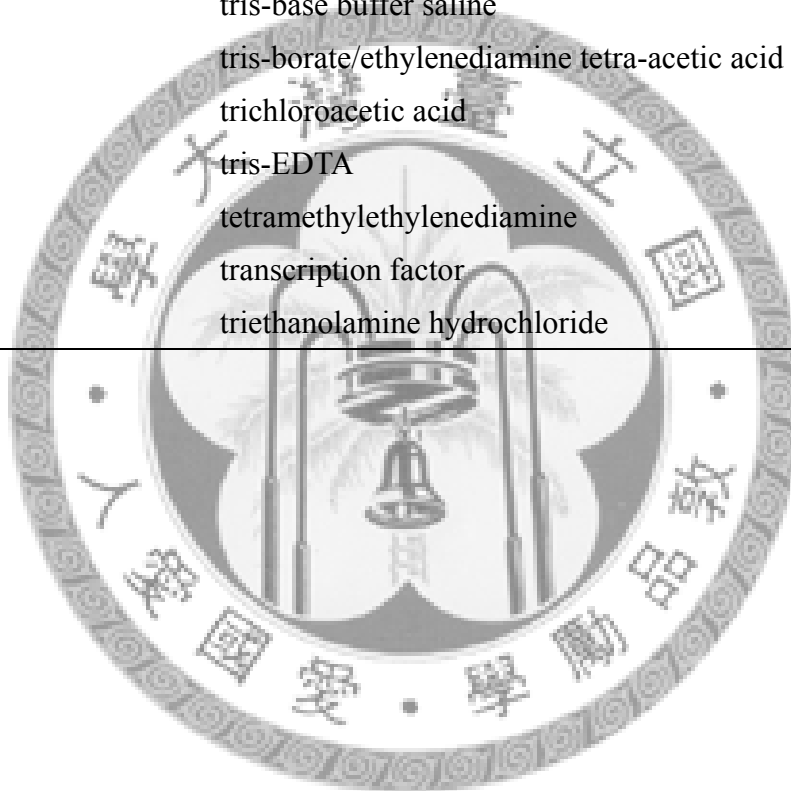
表一、針對澱粉合成、澱粉分解相關基因及蔗糖轉運蛋白設計進行 real-time RT-PCR 之專一性引子.....	81
表二、水稻-2 葉葉鞘於抽穗期間澱粉合成相關基因表現與澱粉含量變化之相關分析.....	83
表三、針對 Microarray 所篩選出之基因設計進行 Real-time RT-PCR 或半定量 RT-PCR 之專一性引子.....	84
表四、以 real-time RT-PCR 分析由 Microarray 所篩選出基因在抽穗期間之表現.....	86
表五、葉鞘澱粉合成主要基因之啟動子序列比對.....	88
表六、設計合成 <i>OsSUTs</i> 與 <i>TRXh</i> 基因啟動子之專一性引子.....	89
表七、設計專一性引子，合成 5'端 deletion <i>OsSUT4</i> 啟動子之片段與 EMSA 之 DNA 探針.....	90
表八、 <i>OsSUT4</i> 基因不同長度啟動子於 TNG67 水稻之轉殖效率.....	91
表九、 <i>OsSUT4</i> 基因啟動子 DF(-550/-484) 片段上已知 <i>cis-acting elements</i>	92
圖一、水稻葉片及葉環相對位置.....	93
圖二、水稻上位葉葉鞘在抽穗期間的澱粉含量變化.....	94
圖三、水稻抽穗期間-2 葉葉鞘醣類含量變化.....	95
圖四、正常抽穗與除去幼穗之水稻植株-2 葉葉鞘澱粉變化趨勢.....	96
圖五、澱粉代謝相關基因於抽穗前之表現趨勢.....	97
圖六、葉鞘中澱粉分解相關基因於抽穗期間之表現.....	98
圖七、葉鞘中 <i>OsSUTs</i> 基因於葉鞘於抽穗期間之表現.....	99
圖八、葉鞘於儲存及供源時期呈現差異性表現基因之分群與歸類.....	100
圖九、葉鞘醣類代謝及分子轉運蛋白相關基因之表現.....	102
圖十、葉鞘中荷爾蒙訊息傳導相關轉錄因子於抽穗期間之表現.....	103
圖十一、植物荷爾蒙對水稻葉鞘生長及其澱粉含量之影響.....	104
圖十二、植物荷爾蒙 ABA 對水稻葉鞘澱粉合成與分解相關酵素活性之影響.....	105
圖十三、植物荷爾蒙 ABA 對水稻葉鞘中 <i>OsSUTs</i> 基因表現之影響.....	107
圖十四、葉鞘中 ABA 含量與澱粉分解酵素活性在抽穗期間的變化.....	108
圖十五、 <i>OsSUT1</i> 基因啟動子序列.....	109

圖十六、 <i>OsSUT2</i> 基因啟動子序列.....	111
圖十七、 <i>OsSUT4</i> 基因啟動子序列.....	112
圖十八、 <i>TRXh</i> 與 <i>Ubi</i> 啟動子之暫時性表現分析.....	113
圖十九、 <i>OsSUT</i> promoter::GUS 暫時性表現質體建構圖 I.....	114
圖二十、 <i>OsSUT</i> promoter::GUS 暫時性表現質體建構圖 II.....	115
圖二十一、 <i>OsSUT1</i> 、2 及 4 啟動子於葉鞘中的暫時性表現分析.....	116
圖二十二、 <i>OsSUT4</i> promoter::GUS 表現質體建構圖.....	117
圖二十三、 <i>OsSUT4</i> 啟動子 5'-deletion 片段活性分析.....	118
圖二十四、EMSA 所用 DNA 探針位置.....	120
圖二十五、 <i>OsSUT4</i> 啟動子片段與葉鞘核蛋白之結合分析.....	121
圖二十六、 <i>OsSUT4</i> 啟動子片段與葉鞘核蛋白之競爭型結合分析.....	122
圖二十七、 <i>OsSUT</i> promoter::GUS 穩定性表現質體建構圖.....	123
圖二十八、 <i>OsSUT</i> promoter::GUS 質體於轉殖水稻植株之表現.....	124
圖二十九、 <i>OsSUT</i> promoter::GUS 質體於轉殖水稻穎花之表現.....	125
圖三十、 <i>OsSUT</i> promoter::GUS 質體於轉殖水稻之啟動子活性分析.....	126
附錄一、木村氏水耕液配方.....	127
附錄二、水稻肥料施加表.....	128
附錄三、pAHC18 map.....	129
附錄四、水稻基因轉殖各培養機配方.....	130

縮寫對照表

簡 寫	全 名
ABA	abscisic acid
ADP	adenosine diphosphate
ADPG	adenosine diphosphate glucose
AGPase	ADP-glucose pyrophosphorylase
APS	ammonium persulfate
BA	N ⁶ -benzyladenine
BAP	N ⁶ -benzylaminopurine
BPMPG7	non-reducing-end blocked <i>p</i> -nitrophenyl maltoheptaoside
BSA	bovine serum albumin
CPK	creatinephosphokinase
DE	debranching enzyme
DEPC	diethyl pyrophocarbonate
DTT	dithiothreitol
EDTA	athylenediaminetetra acetic acid
G1P	glucose-1-phosphate
G6PDHase	glucose-6-phosphate dehydrogenase
GBSS	granule-bound starch synthase
GUS	β-glucuronidase
HK	hexokinase
HRP	horseradish peroxidase
MOPS	3-[<i>N</i> -Morpholino]propanesulfonic acid
MU	7-hydroxy-4-methylcoumarin
MUG	4-methylumbelliferyl β-D-glucuronide
NAA	α-naphthaleneacetic acid
NADP	β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NaOAc	sodium acetate
OsSUT	<i>Oryza sativa</i> sucrose transporter
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
PCr	phosphocreatine
PGM	phosphglucomutase

簡 寫	全 名
PLACE	Plant <i>Cis</i> -Acting Regulatory DNA Elements
PNP	<i>p</i> -nitrophenyl phosphate
PNPG5	<i>p</i> -nitrophenyl- α -D-maltopentaoside
PSUT	promoter of sucrose transporter
PVP-40	polyvinylpolypyrrolidone-40
SBE	starch branching enzyme
SDS	sodium dodecyl sulfate
SSS	soluble starch synthase
TBS	tris-base buffer saline
TBE	tris-borate/ethylenediamine tetra-acetic acid
TCA	trichloroacetic acid
TE	tris-EDTA
TEMED	tetramethylethylenediamine
TF	transcription factor
TRA	triethanolamine hydrochloride



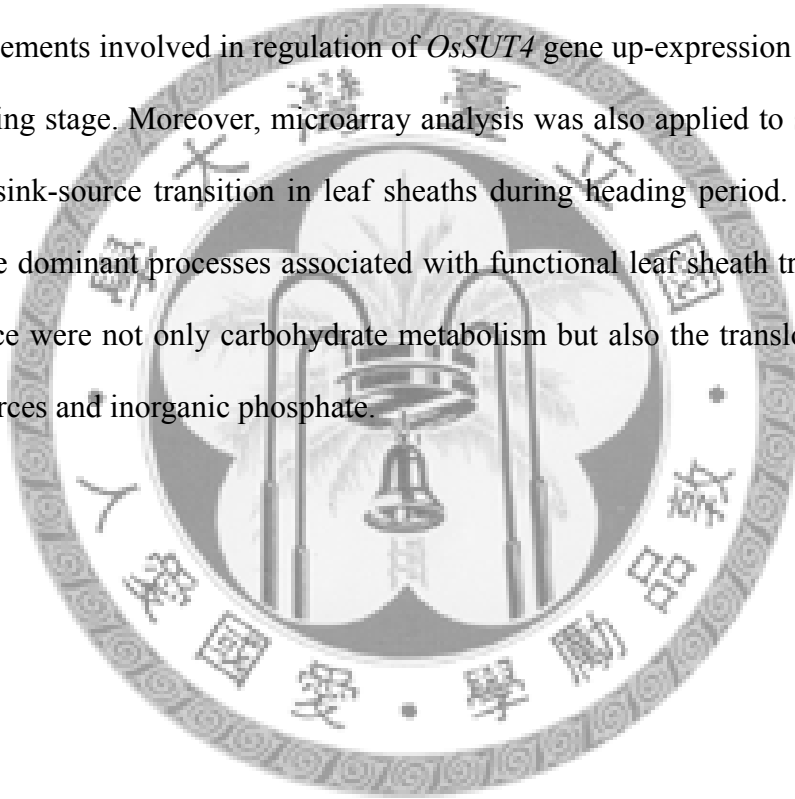
摘 要

水稻上位葉葉鞘為醣類之暫存組織，其在抽穗前會大量累積澱粉，而在抽穗後其儲存之澱粉會快速分解，並合成蔗糖運送到充實中的穀粒，故在抽穗前後期，葉鞘將由儲存組織轉變成供源組織，此現象稱之葉鞘儲存-供源轉換。為了瞭解葉鞘儲存-供源轉換之分子調控機制，本論文以 real-time RT-PCR 分析在水稻抽穗期間，葉鞘中澱粉合成、澱粉分解與蔗糖轉運蛋白 (*sucrose transporter*; *OsSUT*) 等相關基因之表現變化，結果發現 *ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit 2*、*granule-bound starch synthase II*、*soluble starch synthase I*、*starch branching enzyme (SBE) I*、*SBEIII* 及 *SBEIV* 等六個澱粉合成相關基因為影響葉鞘澱粉於抽穗前大量累積之主要基因，且其啟動子共同具有受荷爾蒙調控之序列。另一方面，澱粉分解基因 α -amylase2A、 β -amylase 與蔗糖轉運蛋白基因 *OsSUT1*、4 在抽穗後表現量會增高，其很有可能分別參與葉鞘在抽穗後時期，澱粉分解及將蔗糖裝載到韌皮部之過程。進一步利用各種荷爾蒙處理水稻切離葉鞘以探討這些基因受荷爾蒙調控之情形，結果發現 ABA 會抑制 AGPase 及 GBSS 之酵素活性，但是會大量促進 α -amylase 與 β -amylase 的活性及 *OsSUT1* 及 4 的基因表現量，顯示 ABA 可能為影響葉鞘中醣類代謝反應之因子之一。為了篩選參與水稻葉鞘儲存-供源轉換的調控因子，還藉由基因槍暫時性表現系統，分析 *OsSUT4* 基因之不同長度啟動子於抽穗前後的表現，鑑定出一段 67 bp 之啟動子片段，其可能包含控制 *OsSUT4* 基因於抽穗後大量表現之重要 *cis-acting elements*。此外，以 microarray 技術分析抽穗前後之水稻基因組表現變化，發現 *sucrose synthase*、 β -D-glucan exohydrolase、*sorbitol transporter*、*ammonium transporter* 及 *phosphate transporter* 等基因也於抽穗前後具有差異性表現，暗示不僅澱粉代謝與蔗糖轉運蛋白基因，還有其他醣類代謝途徑與胺基酸、無機磷之運送亦參與葉鞘儲存-供源之轉變過程。

Abstract

Upper leaf sheath of rice (*Oryza sativa* L.) serves as a temporary carbohydrate sink tissue before panicle heading. Starch pre-stored in upper leaf sheaths prior to heading would be remobilized to filling grains at post-heading stage. Thus, upper leaf sheaths could be converted to source tissues from sink tissue during heading period. The process of starch changes in leaf sheath is defined as the sink-source transition. The purpose of this project is to reveal the molecular mechanism of the sink-source transition in rice leaf sheaths during heading period. First, the expression profiles of genes involved in starch synthesis pathway were analyzed and compared to starch content in the second leaf sheath below the flag leaf. The results indicated the changes of *ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit 2 (AGP-L2)*, *granule-bound starch synthase II (GBSSII)*, *soluble starch synthase I (SSSI)*, *starch branching enzyme (SBE) I*, *SBEIII*, and *SBEIV* mRNA levels were highly correlated with starch content changes during the heading period in the leaf sheath, and these starch synthesis-related gene promoters shared several common hormone-responsive elements. In addition, the *α-amylase2A* and *β-amylase* were considered as major genes that regulated the starch degradation at the post-heading period. Of the five sucrose transporter (*OsSUT*) genes, *OsSUT1* and *OsSUT4* appeared to play an important role in sucrose loading into the phloem of source leaf sheaths. Besides, to reveal whether phytohormones were the factors to control the starch metabolism-related enzyme activities and *OsSUTs* gene expressions, the effects of GA, ABA and BAP on expressions of these enzymes and genes in detached leaf sheaths were examined. The results indicated that not only the expressions of *OsSUT1* and *4* but the activities of *α-amylase* and *β-amylase* can be enhanced by ABA, suggested that ABA is one of the factors to regulate the carbohydrate metabol-

ism in leaf sheaths. Since *OsSUT4* gene was significantly up-regulated at post-heading stage, it was used as an indicator gene to identify the molecular mechanism of sink-source transition in leaf sheaths. In order to find the *cis*-acting elements on *OsSUT4* promoter involved in controlling rice leaf sheaths sink-source transition during the heading period, we constructed nine various 5'-deletion *OsSUT4* promoter fragments containing *GUS* reporter gene and analyzed the activities by particle bombardment assay. A 67-bp promoter fragment was identified, which might contain important regulatory elements involved in regulation of *OsSUT4* gene up-expression in leaf sheath at post-heading stage. Moreover, microarray analysis was also applied to study the mechanism of sink-source transition in leaf sheaths during heading period. The data implied that the dominant processes associated with functional leaf sheath transition from sink to source were not only carbohydrate metabolism but also the translocation of the nitrogen sources and inorganic phosphate.



前 言

1. 水稻葉鞘於抽穗前後期所扮演之角色

水稻於穀粒成熟階段，除了穀粒本身合成及蓄積養分的能力外，供源組織能否提供充足的醣類來源，是決定最終產量的重要因子之一。水稻穀粒充實所需之醣類的主要供應來源有二：(一) 生殖生長期，由成熟葉進行光合作用所產生之光合產物；(二) 於抽穗前即累積在莖部（葉鞘或莖稈）的非結構性醣類。水稻莖部累積之非結構性醣類種類以澱粉為主，其大多分布於莖稈和葉鞘的維管束周圍以及薄壁組織中，其中以葉鞘薄壁組織為最主要的儲存地點 (Baba and Kisutaka, 1953)。抽穗前兩週，澱粉於上位葉葉鞘中開始累積，約至抽穗時會達到最大量，而在抽穗之後開始降解。經澱粉分解後所形成之可溶性醣類將轉化形成蔗糖，進一步運移至發育中之穀粒，以做為穀粒充實所需之碳源 (Perez et al., 1971; Samonte et al., 2001)。水稻葉鞘在抽穗前後期，由儲藏澱粉的儲存組織 (sink tissue) 轉變成供應醣類的供源組織 (source tissue) 之過程稱為儲存-供源轉變 (sink-source transition)。經 ^{14}C 同位素標定分析研究，顯示抽穗前即累積在莖部的醣類約有 68% 會於抽穗後轉運至穀粒，且抽穗前莖部之暫存性醣類的含量與最終穀粒產量呈現絕對正相關 (Cock and Yoshida, 1972; Ishikawa et al., 1993; Samonte et al., 2001)。此外，當穀粒充實如遭遇不良生長環境時，莖部於儲存時期 (sink stage) 所累積的醣類則更顯其重要性。例如當穀粒充實期遇到缺水逆境時，會導致葉片光合作用能力下降，無法提供穀粒充實所需要之碳源，此時莖稈中 α -amylase、 β -amylase 及 sucrose phosphate synthase 之酵素活性會提升，促進莖部預先儲藏的澱粉降解及蔗糖合成，並加快醣類從莖部轉運到穀粒的速度，縮短穀粒充實期，以盡速補充穀粒充實所需的碳源 (Yang et al., 2001a; Yang et al., 2001b)。因此，預先儲存在莖稈和葉鞘中的醣類可扮演碳源緩衝者 (buffer) 之重要角色 (Soga and Nozaki, 1957;

Yoshida, 1972; Blum et al., 1994)，減少環境逆境對穀粒產量所造成的負面影響，進而避免產量下降。

2. 葉片儲存-供源轉換之相關研究

前人對於植物體儲存-供源轉換的研究大多集中在發育中的葉片上，所有葉片生長過程都會歷經由儲存狀態轉變到供源狀態的過程。葉片於初發育時，必須依賴植物體其他部分供給醣類來源（此時為儲存期），等到葉片完全展開時，其體內光合作用效率增加（Turgeon and Webb, 1975），直到可以提供本身生長為止。當光合產物的含量累積到超過本身葉片生長與呼吸作用所需時，葉片必須維持細胞中醣類的平衡，此時，即轉變成碳源的輸出者（此時為供源期）。早期利用放射線標定法觀察發育中葉片的醣類運移與分佈，發現當葉片生長到全部面積的30~60%時，頂端開始停止碳源的輸入，而葉片的基部仍然持續輸入碳源，證實葉片由頂端向基部成熟的同時，亦伴隨儲存-供源的轉變由葉片頂端往葉柄方向發生（Jones and Eagles, 1962; Turgeon and Webb, 1975）。早期在探討葉片儲存-供源轉換的研究時，偏重在未成熟葉片與成熟葉片部分之生理特性或結構上的差異，例如在成熟的供源期葉片中，碳同化作用增加、氣孔導度增高、可溶性醣類被合成等等（Turgeon, 1989）。結構上的研究發現菸草葉在儲存期葉片上主要使用較大的葉脈進行卸載（unloading）醣類的工作，而供源期葉片部分則是使用較小的葉脈進行醣類裝載（loading）（Ding et al., 1988）。另外，Imlau等人（1999）還發現細胞間連絡絲（plasmodesmata）會隨著儲存-供源轉換而由簡單變成具有分支的形態，簡單的細胞間連絡絲可運載較大分子量的蛋白質，而有分支的細胞間連絡絲相對僅能讓小分子量的溶質通過，在儲存型的葉片中大部分以簡單型細胞間連絡絲為主，可以快速補充儲存細胞生長所需的營養物質。Wright等人（2003）利用具有供源期專一表現的阿拉伯芥蔗糖轉運蛋白*AtSUC2*基因啟動子，於轉殖菸草中探討葉片儲存-供源轉變的調控機制，證實遮光會影響儲存期葉片轉變成供源期葉片，並推測光

線或光照下的產物可能會影響葉片儲存-供源之轉換。而植物荷爾蒙也會影響葉片儲存-供源的轉換，Sokolova等人 (2002) 利用¹⁴C放射線標定蔗糖的流向，觀察BA對儲存期葉片的影響，發現其會促進週圍蔗糖流入N⁶-benzyladnine (BA) 處理的葉片部分，增強積儲的能力。而若是將Gibberellic acid (GA) 處理在供源時期的蠶豆葉片上，則會促進¹⁴C-sucrose由供源期葉片輸出 (Aloni et al., 1986)。同一葉片上儲存期部分與供源期部分的內生荷爾蒙含量也不相同，Thorsteinsson等人 (1990) 偵測發育中白樺樹葉片上的Abiscisic acid (ABA) 與Indoleacetic acid (IAA) 含量，發現在儲存期的葉片部分，相較於供源期葉片部分，具有較高的ABA含量及較低的IAA含量，暗示ABA與IAA參與在葉片發育的調控上。

3. 水稻澱粉合成之相關基因

水稻葉鞘由儲存組織轉變為供源組織之過程，可依醣類的代謝變化分成三個階段：(一) 澱粉合成期，葉鞘於抽穗前會大量累積澱粉；(二) 澱粉降解期，抽穗之後原本儲存於葉鞘中的澱粉開始降解，以形成可溶性醣類；(三) 蔗糖轉運期，重新合成之蔗糖於此時期開始運移至穀粒中。

抽穗前，大量累積澱粉之階段，一般來說，有三大類酵素參與植物體中澱粉的合成過程：ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase)、starch synthase (SS)及starch-branching enzyme (SBE)。AGPase 催化澱粉合成速度的決定步驟，主要負責glucose-1-phosphate (G1P) 與 adenosine 5' -triphosphate (ATP) 之反應，形成ADP-glucose (ADPG)，而ADPG為合成澱粉之基質 (substrate)。植物的AGPase是由兩個大次單元 (large subunit) 及兩個小次單元 (small subunit) 所組成的異型四聚物 (heterotetramers)。AGPase具有許多調控特性，大部分植物的AGPase會受到3-phosphoglyceric acid (3-PGA) 的活化，而受到 phosphate (Pi) 抑制 (Ghosh and Preiss, 1966; Sikka et al., 2001)，但不同組織間的AGPase對3-PGA/Pi之敏感度並不同，例如水稻發育中種子之AGPase活性，相較於葉片中的AGPase，其對3-PGA

及 Pi 具有較高的敏感度 (Sikka et al., 2001)。目前發現水稻中有兩個小次單元 *AGPase* 基因: *AGP-S1* 及 *AGP-S2* 與四個大次單元 *AGPase* 基因: *AGP-L1*、*AGP-L2*、*AGP-L3* 及 *AGP-L4*，而由 cDNA database 的搜尋結果顯示 *AGP-S2* 基因有兩個轉錄產物，分別命名為 *AGP-S2a* 與 *AGP-S2b*。Lee 等人 (2007) 利用 AGP::GFP 融合蛋白技術偵測這些 *AGPase* 蛋白於細胞中的分佈位置，發現 *AGP-S2b* 與 *AGP-L1* (*AGP-L2*；Lee et al., 2007) 是屬於細胞質中的 *AGPase*，而其他四個 *AGPase* 則位於葉綠體或澱粉體中。水稻葉身主要表現之 *AGPase* 基因為 *AGP-S2a* 與 *AGP-L3*，葉鞘則以 *AGP-S1* 與 *AGP-L2* 為主，而 *AGP-L1*、*AGP-L2*、*AGP-S1* 及 *AGP-S2b* 等基因則於水稻胚乳中大量表現 (Hirose et al., 2006； Lee et al., 2007)。

Starch synthase 可依其在葉綠體或澱粉體中的位置而區分成兩種，一種是可與澱粉粒結合之 granule-bound starch synthase (GBSS)，另一種則是存在於基質 (stroma) 中的 soluble starch synthase (SSS)。GBSS 負責直鏈澱粉 (Amylose) 的延長，水稻中已發現兩個 GBSS isoforms: GBSSI 及 GBSSII，GBSSI 主要在儲藏組織 (storage tissue) 中進行澱粉的合成 (Smith et al., 1997)，例如在缺少 GBSSI 的 *waxy* 水稻中，胚乳中的澱粉粒即缺乏直鏈澱粉，但在其他器官和組織中的澱粉粒仍然含有直鏈澱粉 (Blakeney and Matheson, 1984)，而較晚被發現的 GBSSII 則在非儲藏性組織 (nonstorage tissue) 中負責澱粉之合成 (Vrinten and Nakamura, 2000)。關於 SSS，其功能為延長支鏈澱粉 (Amylopectin)，目前水稻中有四個 SSS isoforms: SSSI、SSSII、SSSIII 及 SSSIV，除了 SSSI 以外，其他 isoforms 均具有兩個以上 isogenes，形成一個基因家族 (gene family)。不同 SSS isoform 負責產生不同長度的支鏈，例如 SSSI 偏好支鏈的聚合程度 (degree of polymerization, DP) 為 DP8-12 (Nakamura, 2002)，而 Edwards 等人 (1999) 利用馬鈴薯表現反義 *SSSIII*，證明 SSSIII 偏好合成 DP25-35 的支鏈。

SBE 負責之功能為在直鏈或支鏈澱粉上生成 $\alpha(1\rightarrow6)$ 糖苷鍵連接的支鏈，水稻中已經發現有 SBEI、III 與 IV 三種 isoforms。植物中的 SBE 可依胺基酸序列的相

似度區分成家族 A (family A) 及 B (family B) (Burton et al., 1995)，家族 A 的 SBE 胺基酸序列的 N 端處比家族 B 多了 60-100 個胺基酸，但是在 C 端則缺少 50 個胺基酸，其中包含了水稻的 SBEIII 和 SBEIV、玉米的 SBEII 及豌豆的 SBEI，而水稻的 SBEI、玉米的 SBEI 及豌豆的 SBEII 則屬於家族 B。兩家族中的 SBE 對基質 (substrate) 的偏好程度及轉移的支鏈長度都有所不同，例如玉米的 SBEI 對直鏈澱粉的親和性較高，而玉米的 SBEII 則較偏好於支鏈澱粉上加上支鏈 (Guan and Preiss, 1993)。

4. 水稻澱粉分解之相關基因

水稻抽穗之後，上位葉葉鞘中澱粉分解的代謝反應開始進行。在植物體營養器官中負責澱粉分解之酵素可歸納成下列幾步驟：(一) 由澱粉粒分解成直鏈水溶性葡聚糖 (soluble glucans)，負責的酵素是 α -amylase 及 debranching enzyme (DBE)。 α -amylase 是作用在 glucosyl bonds 的內切酶，澱粉粒的表面結晶結構會先被 α -amylase 分解成具有分支 (branched) 和直鏈 (linear) 的水溶性葡聚糖，目前已知水稻中有十個 α -amylase isogenes，而主要表現在葉部組織的有 α -amylase 1A, 2A, 3D and 3E 四個 isogenes (Thomas et al., 1994)。DBE 負責作用切斷葡聚糖分子之 $\alpha(1-6)$ 糖苷鍵的鍵結部分，使支鏈葡聚糖轉變成直鏈葡聚糖後，再供其他澱粉分解酵素繼續作用。DBE 可與 SBE 一起決定支鏈澱粉的分支程度，故 DBE 也可以參與在澱粉合成的反應中。已經發現植物體中有四種 DBE 酵素: pullulanase (PUL)、isoamylase 1 (ISA1)、ISA2 及 ISA3 (Nakamura, 1996)。在水稻種子成熟的階段，可偵測到高表現量的 PUL 與 ISA1 基因，而在水稻葉身則以 ISA3 基因表現量最高 (Ohdan et al., 2005)。以阿拉伯芥突變株實驗證實 ISA1 與 ISA2 並不參與葉片澱粉的分解，但是會使澱粉的合成過程不正常 (Zeeman et al., 1998)，而 ISA3 突變株會使夜晚中葉片的澱粉含量變高；(二) 直鏈水溶性葡聚糖有兩種代謝路徑，一個稱做 phosphorolytic pathway，是藉由葉綠體中的 α -glucan phosphorylase (AtPHS1; Pho1)

催化直鏈葡聚糖的非還原端，釋放出 glucose-1-phosphate (G1P)。另一途徑稱做 hydrolytic pathway，主要提供輸出葉綠體的醣類來源，是藉由 β -amylase 切斷葡萄糖聚合分子的 $\alpha(1\rightarrow4)$ 糖苷鍵，且作用位置由澱粉非還原端處開始進行酵素反應，將直鏈葡聚糖分解成 maltose (Lao et al., 1999)，經由位於葉綠體內膜上的 maltose transporter (MEX1) 運送到細胞質中 (Nittylä et al., 2004)。種子中的 β -amylase 在萌芽前即存在於胚乳中，經蛋白酶作用移去 C 端的部分胺基酸片段後，即會從不活化狀態 (inactive form) 轉變成具有活性之酵素 (active form)。進一步利用阿拉伯芥突變株的實驗顯示，植物中經由 β -amylase 分解直鏈葡聚糖之 hydrolytic pathway 較 phosphorolytic pathway 重要；(三)由 α -amylase 與 β -amylase 作用後之產物：maltose、短鏈 glucans、maltosaccharides 或 limit dextrins 等，均可由 α -glucosidase 分解成葡萄糖。

5. 澱粉代謝相關基因之影響因子

目前已知澱粉代謝相關基因在其他組織會受到一些訊息分子的調控：(一) Scheible 等人 (1997)曾經在菸草中發現硝酸 (nitrate) 可以藉由降低 3-PGA 的濃度及抑制小次單元 *AGPase* 之基因表現而調控澱粉合成；(二) 阿拉伯芥 *AGPase* (Sokolov et al., 1998)、甘藷 *GBSSI* (Wang et al., 2001)、馬鈴薯 *AGPase*、*GBSSI*、*SSSII*、*SSSIII* (Visser et al., 1991; Nakata and Okita, 1995; Kossmann et al., 1999)、樹薯 *SBE* (Salehuzzaman et al., 1994)、水稻 α *Amy3/\alpha*-amylase3*D*、 α *Amy7/\alpha*-amylase1*A*、 α *Amy8/\alpha*-amylase3*E* (Sheu et al., 1996) 都會受到醣類的調控；(三) 植物荷爾蒙 ABA、GA 與 cytokinin 也被證實可以影響澱粉代謝相關基因的表現 (Miyazawa et al. 1999; Itoh et al., 1995; Rook et al. 2001, Akihiro et al. 2005; Wang et al. 2006)，而目前仍然未知這些訊息分子是否也於葉鞘中影響醣類代謝相關基因之表現，進而控制葉鞘儲存-供源的轉變。

6. 水稻蔗糖轉運蛋白基因之相關研究

葉鞘中的澱粉分解後，需重新合成可運移的醣類，而蔗糖為植物體中不同組織間醣類運輸的主要形式，其藉由韌皮部進行長距離的運送。蔗糖在葉肉細胞合成之後，可以經由兩種途徑進入韌皮部之篩管或伴細胞：(一) 藉由蔗糖轉運蛋白 (H^+ /sucrose transporter; SUT) 經 apoplastic pathway 進入 sieve element-companion cell (SE-CC)；(二) 藉由細胞間連絡絲 (plasmodesmata) 經 symplastic pathway 進入到 SE-CC 中。蔗糖轉運蛋白對於植物組織間碳源的分配佔有重要的角色，若以反義股基因 (antisense gene) 或 RNA 干擾 (RNAi) 轉殖方式抑制細胞內蔗糖轉運蛋白的表現，則會顯著影響植物體醣類運輸情形及其相關生理反應 (Kühn et al., 1996; Scofield et al., 2002; Kühn et al., 2003; Chincinska et al., 2008)。早期 Aoki 等人 (2003) 依照胺基酸的序列相似度將植物蔗糖轉運蛋白分成 Type I、II 及 III 三群，每一群對基質的親和性有所不同 (Lemoine, 2000; Kühn, 2003)。Type I SUTs 為 high-affinity/low-capacity 的轉運蛋白 ($K_m=139 \mu M-1.5 mM$)，而 Type III 轉運蛋白則具 low-affinity/high-capacity ($K_m=5-6 mM$) 的特性。Type II 的成員在胺基酸序列上和其他兩群有很大的差異，其具有較長的 N 端 (N-terminal) 及中心環圈 (central loop)。隨著被發現的 *SUT* 基因增多，Sauer (2007) 重新分析已知 *SUT* 基因的演化關係，將其分成四條進化分支，原先 Aoki 等 (2003) 所提出之 Type II subfamily 被進一步分成兩群。Braun 等人 (2009) 更加入了高粱、玉米及二穗短柄草等禾本科植物的 *SUT* 基因來進行分群，依照序列同源性分成五群，原先的 Type I subfamily 屬於 Group 2，只包含雙子葉植物的 *SUT* 基因；而 Type II subfamily 則分別分成 Group 1、5、3 三群，前兩群只具有單子葉植物之 *SUT* 基因，而 Group 3 與 Group 4 (早期的 Type III) 則均包含單子葉及雙子葉的 *SUT* 基因。

Hirose 等人 (1997) 篩選出水稻第一個 *SUT* 基因，稱之為 *OsSUT1*，亦為單子葉植物中第一個被篩選到的 *SUT* 基因。Aoki 等人 (2003) 利用水稻 *OsSUT1* 及大麥 *HvSUT2* 的基因序列比對找到水稻另外四條 *SUT* 基因，分別命名為 *OsSUT2*、3、

4 及 5。*OsSUT1* 屬於 Group 1 轉運蛋白，也是目前被研究較為詳盡的水稻轉運蛋白，在發育中的穀粒，*OsSUT1* 主要表現在發育的中後期。在細胞層次的位置上，*OsSUT1* 已經被證實表現在母系珠心突出處 (maternal nucellar projection)、珠心表皮細胞 (nucellar epidermis) 及糊粉層組織 (aleurone tissue)，其可能參與母系細胞的蔗糖進出及糊粉層細胞的蔗糖吸收過程。*OsSUT1* 也會在胚組織、葉鞘及莖稈韌皮部的伴細胞表現 (Hirose et al., 1997; Matsukura et al., 2000; Furbank et al., 2001; Aoki et al., 2003)，推測其可能做為上述組織中的韌皮部裝載者 (phloem loader) (Furbank et al., 2001)。

OsSUT2 屬於 Group 4 轉運蛋白的一員，其基因之功能及生理特性到目前為止仍然不清楚。已知其他同屬於 Group 4 之 *HvSUT2*、*AtSUT4* (Endler et al., 2006) 及 *LjSUT4* 轉運蛋白位於細胞液胞膜上，推測具有交換細胞質與液胞間蔗糖的功能。但並非所有的 Group 4 轉運蛋白均位於液胞膜上，例如馬鈴薯之 *StSUT4* 即是表現在葉片細胞膜及核周圍的內膜上 (endomembranes) (Chincinska et al., 2008)。

OsSUT3 與 *OsSUT1* 同屬 Group 1，其大量表現在發育中的花粉，推測其可能參與在蔗糖運移至花粉的途徑中 (Takeda et al., 2001; Ngampanya et al., 2002)。*OsSUT3* 也被發現在發芽中的種子、幼根、節間、儲源及供源時期的葉身與葉鞘等組織中表現 (Aoki et al., 2003; Scofield et al., 2007)。

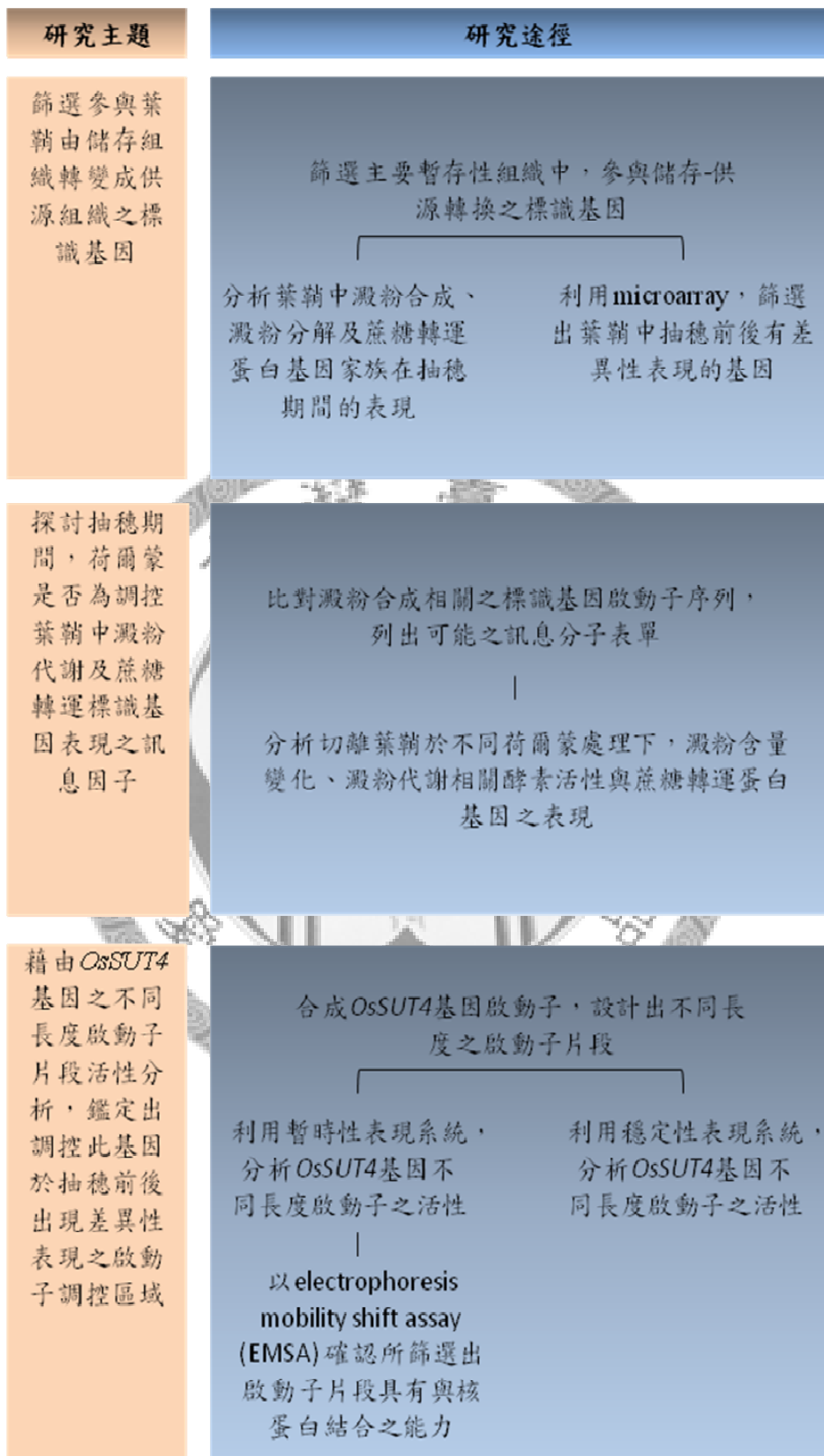
OsSUT4 及 *OsSUT5* 分別屬於 Group 3 及 Group 5 的族群，此兩群蔗糖轉運蛋白之功能尚未清楚，僅知此兩基因在所有水稻組織均有表現 (Aoki et al., 2003)。早期依 Group 3 中發現之基因序列特性及其缺乏轉運活性的特點，推測其扮演感應蔗糖之功能 (Barker et al., 2000)，但近期研究則指出仍有許多 Group 3 *SUT* 基因可轉譯出具有轉運功能之蔗糖轉運蛋白 (Meyer et al., 2000)。

若藉由探討水稻葉鞘中醣類在抽穗前後的合成、分解及轉運之代謝路徑，將有助於瞭解其葉鞘儲存-供源轉換的調控機制。然而大部分的醣類代謝酵素都是由多基因家族轉譯出來的，同一個基因家族中之不同基因可能具有發育時期之表現與

組織專一性的差異，如果可以界定出每一個酵素中基因層次上的貢獻，找出主要調控基因及其調控因子，將會有助於了解水稻葉鞘在抽穗期間其澱粉代謝與蔗糖轉運的調控機制。

7. 本論文之試驗架構及意義

為了瞭解水稻葉鞘於抽穗期間儲存-供源轉換的分子調控機制，本論文主要以下列幾種策略進行研究：(一) 首先利用 real-time RT-PCR 技術，分析葉鞘中澱粉合成、澱粉分解與蔗糖轉運蛋白相關之各種 isogene 於抽穗期間的表現變化，篩選可能參與水稻葉鞘儲存-供源轉換時期之關鍵基因；(二) 除了澱粉代謝與蔗糖轉運外，還藉由 microarray 技術，進行篩選葉鞘中在抽穗前後有差異性表現的基因，以期能更了解葉鞘儲存-供源轉換時期之其他生理代謝途徑；(三) 藉由荷爾蒙處理水稻切離葉鞘實驗，探討植物荷爾蒙是否可能參與葉鞘中於抽穗期間的醣類代謝調控；(四) 選擇一個葉鞘儲存-供源轉變的標識基因 (*OsSUT4*)，藉由其不同長度啟動子片段活性分析，鑑定出調控此基因於抽穗前後出現差異性表現之啟動子調控區域。預期在我們的研究策略下，能更了解水稻葉鞘於抽穗期間儲存-供源轉換之分子調控機制。



材料與方法

1. 植物材料、種植與處理方法

1.1. 植物材料

由高雄改良場提供之九十四年第二期台農六十七號水稻種子 (*Oryza sativa* L. cv Tainung 67; TNG67)

1.2. 種子消毒及發芽

- (1) 將 TNG67 水稻種子以 1% (v/v) NaOCl₄ 消毒 30 分鐘並以蒸餾水沖洗 4-5 次，放置在鋪有濕潤擦手紙之玻璃培養皿中。
- (2) 於 37°C 培養箱中黑暗培養 2 天。
- (3) 第三天時將種子移到水耕杯中，約 3-4 天更換一次木村氏水耕液 (Chu and Lee, 1989) (附錄一)，於 30/25°C (日溫/夜溫) 玻璃光照室中生長兩星期。
- (4) 將三葉齡大的幼苗移到含有培植土的長方盆中 (長/寬/高=62/36/24 公分)，每盆種植 15 株水稻幼苗或是方形盆中 (長/寬/高=20/20/27 公分)，每盆種植 4 株。
- (5) 於水稻幼苗移盆時添加基肥，分別於移盆一個月及兩個月時施加追肥 (附錄二)。

1.3. 於抽穗前估計抽穗時間之方法

利用劍葉葉環和劍葉底下第一葉 (-1 葉) 的葉環距離 (圖一) 來判斷抽穗前的天數 (Matsuzaki and Rutger, 1991)，TNG67 水稻於夏季生長時，兩葉葉環距離為 -4±1、0、4±1 及 9±1 公分時，分別代表植株生長階段為抽穗前 20、15、10 和 5 天。於冬季生長的植株，兩葉葉環距離為 -4±1、0 及 4±1 公分時，分別代表植株狀態為抽穗前 15、10 和 5 天 (圖一)。

1.4. 切離葉鞘處理荷爾蒙之方法

- (1) 分別配製 100 mM ABA [Sigma, Canada]、GA [Sigma, USA] 及 N⁶-benzylaminopurine (BAP) [Sigma, UK] 之荷爾蒙儲存液，使用時以千分之一體積加到水中，配置成濃度為 100 μM 之荷爾蒙處理液。
- (2) 將水稻-2 葉葉片以上部分從節點下端約 5 公分處切下，慢慢抽離-1 葉葉片以上部分，僅剩下-2 葉葉片並浸泡於荷爾蒙處理液中。
- (3) 放置在 25°C/20°C(日溫/夜溫)之自然光照室，培養 24 小時後，測量葉身及葉鞘長度變化量後，去掉葉身及節以下部分，液態氮急速冷凍後，儲存於 -80°C 冰箱中備用。

1.5. 基因槍射擊之材料處理

將儲存時期與供源期的水稻-2 葉葉鞘由植株上切離下來，以節點為起點，取出 6 公分長度的葉鞘，將之分割成 1 X 0.3~0.5 大小的片狀後，以內面朝上平鋪在不含蔗糖的 MS 培養基上 (附錄四)，並緊密整齊排列在培養皿中間。

2. 醣類定性與定量分析

2.1. 澱粉碘染觀察

將儲存期及供源期的水稻-2 葉葉鞘從植株上分離下來，利用徒手切片方式橫切葉鞘底部，再以 I₂/KI (0.6 g/6 g) 染色 30 秒，以擦手紙吸去過多的碘液後，放置光學顯微鏡下觀察。

2.2. 以酵素法測定澱粉含量

參考 Keppler 與 Decker (1974) 方法進行澱粉含量測定

- (1) 用研鉢和杵在液態氮下將葉鞘研磨成粉末，於 80°C 烘乾 12 小時後，測量其乾重。

- (2) 以 5 mL 之 80% (v/v) ethanol 於 80°C 水浴中萃取 5 分鐘，除去可溶性醣類。
- (3) 以 4°C、3,000 x g 離心 10 分鐘後，小心移除 ethanol (重複步驟 2-3 二次)。
- (4) 於抽氣機中抽乾上清液。
- (5) 用 3 mL 滅菌水將沉澱物懸浮起來，並在 100°C 水浴作用 2 小時。
- (6) 配製濃度為 5 mg/mL 之澱粉溶液一起進行糊化，並製作標準曲線 (分別含 50、100、150、200 與 250 µg 之澱粉)。
- (7) 取 50 µL 樣品與澱粉標準品，加入 150 µL 酵素反應液 (1.2 U amyloglucosidase [Sigma, USA]、0.15 U pullulanase [Sigma, Israel])，於 55°C 作用 1.5 小時。
- (8) 再於 100°C 作用 5 分鐘，使酵素失去活性。
- (9) 以 4°C、7,840 x g 離心 10 分鐘後，吸取 0.1 mL 上清液於測光管中。
- (10) 加入 1 mL TRA buffer (0.3 M triethanolamine hydrochloride、4.05 mM MgSO₄, pH7.5)，內含 0.65 mg ATP、0.952 mg β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) 及 5 µL glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDHase)[Roche, Germany]，混合均勻後，測定 OD₃₆₅ 數值為 E1。
- (11) 加入 5 µL TRA buffer，內含 0.3 U hexokinase (HK) [Sigma, USA]，混合均勻後反應 30 分鐘，測定 OD₃₆₅ 數值為 E2。
- (12) 利用 E2-E1 之數值對照澱粉標準曲線計算出澱粉含量。

2.3. 以酵素法測定蔗糖與葡萄糖含量

參考 Nakamura (1989) 等人方法進行蔗糖與葡萄糖含量測定

- (1) 用液態氮將水稻葉鞘研磨成粉末，於 80°C 烘乾 12 小時後測量其乾重。
- (2) 加入 4 mL 80% (v/v) ethanol，於 80°C 水浴作用 5 分鐘，溶解出可溶性醣類。
- (3) 以 4°C、3,000 x g 離心 10 分鐘，收集上清液後重複步驟 2-3 二次，將上清液體積補到 10 mL。

- (4) 取 0.1 mL 上清液兩份，於真空抽氣機抽乾。
- (5) 一管加入 0.4 mL 0.1 M acetate buffer (pH4.6)，另一管加入 0.3 mL acetate buffer 及 0.1 mL invertase solution (20 mg/mL in acetate buffer, pH4.6)，於 55°C 作用 1 小時。
- (6) 再於 100°C 作用 5 分鐘，使酵素失去活性。
- (7) 以 4°C、7,840 x g 離心 10 分鐘，吸取 0.1 mL 上清液到測光管中。
- (8) 配製體積為 0.1 mL 之葡萄糖標準曲線 (分別含有 0、10、20、30、40 及 50 µg 葡萄糖)。
- (9) 將上清液及標準液加入 1 mL TRA buffer，內含 0.65 mg ATP、0.952 mg NADP 及 6.6 U G6PDHase，混合均勻後，測定 OD₃₆₅ 數值為 E1。
- (10) 加入 5 µL TRA buffer，內含 0.3 U HK，混合均勻反應 30 分鐘，測定 OD₃₆₅ 數值為 E2。
- (11) 利用 E2-E1 的數值對照標準曲線算出葡萄糖含量。
- (12) 未加 invertase 的樣品可計算出本身葡萄糖含量，將有加 invertase 及未加 invertase 的量相減，可得到經由轉化的葡萄糖含量，利用相同莫耳數計算蔗糖含量。(Glucose_{wr} = 180.16, Sucrose_{wr} = 342.29)

3. 基因表現分析

3.1. 葉鞘總 RNA 萃取

以 Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) 抽取水稻葉鞘總 RNA 後，利用 TURBO DNA-freeTM kit (Ambion, USA) 去除殘存的基因組 DNA。

3.2. 即時反轉錄聚合酶連鎖反應 (Real-time RT-PCR)

使用 Brilliant[®] SYBR[®] Green QRT-PCR Master Mix Kit (Stratagene, USA)，並以 Stratagene MX3000PTM 機器進行即時反轉錄聚合酶連鎖反應，所得結果利

用 MxPro QPCR Version 3.00 軟體進行分析。針對即時反轉錄聚合酶連鎖反應對目標基因設計專一性引子 (表一)，並於適當的黏合溫度下進行片段的擴增。Real-time RT-PCR 反應以總體積 25 μ L 進行 (200 ng RNA template, 1X master mix、0.1-0.5 μ M forward primer、0.1-0.5 μ M reverse primer、30 nM reference dye、1 μ L StrataScript RT/RNase Block Enzyme Mixture)，程序條件如下：50°C 反轉錄 30 分鐘，接著以 95°C 反應 10 分鐘，然後進入 40 個循環的 PCR 反應，每一個循環的溫度為 95°C/1 分鐘，適當的黏合溫度/1 分鐘，72°C/1 分鐘。分析基因表現時，以 *Actin* 或 *Ubiquitin* 基因做為 internal control，利用 Ct 值計算出相對表現量(Relative quantitation)，計算方式如下所示：

$$\text{Target gene/Actin} = 2^{-(\text{Ct Actin} - \text{Ct Target gene})} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

4. Microarray 分析

- (1) 抽取抽穗前 10 天及抽穗後 5 天-2 葉葉鞘總 RNA，分別當作儲存時期及供源時期樣品，送基因數碼科技股份有限公司進行 Microarray 分析，步驟如下。
- (2) 總 RNA 樣品 (1 μ g) 經過 DNase I 酵素處理後，以 MessageAmp aRNA kit (Ambion, Austin, TX) 合成 cDNA。
- (3) 將儲存時期 RNA 標定螢光物質 Cy3，而供源時期 RNA 標定螢光物質 Cy5。
- (4) 依照 Oligonucleotide Microarray Hybridization protocol 方式，以包含 20,000 條寡核苷酸的 Rice Oligo Microarray 晶片 (Agilent Technologies, USA) 與標定螢光物質的 cDNA 進行雜合反應。
- (5) 所得到數據以 GenePix4000B scanner 及 GenePix Pro 5.1 software 進行結果掃描和分析。
- (6) 基因表現差異依照供源時期樣品和儲存時期樣品之螢光比值 (Cy5/Cy3) 來定義，當 Cy5/Cy3 比值大於 1 時，表示此基因在供源時期是提高表現；

而當比值小於 1 時，表示此基因在供源時期是降低表現。

- (7) 挑選出 Microarray 晶片上 *Actin* 及 *G6PDHase* 基因做為對照組基因，其中有 16 個 *Actin* 基因其 source 比 sink 時期比值為 0.6 到 1.9; 有 5 個 *G6PDHase* 基因比值從 0.7 到 1.3。
- (8) 挑選螢光比值超過三倍的基因 (Cy5/Cy3 大於 3 及小於 1/3) 當作兩個時期有差異性表現的基因，並依照其功能進行分類。
- (9) 選出 30 個基因並設計專一性引子 (表三)，收取抽穗期間-2 葉葉鞘材料，進行 real-time RT-PCR 分析，確認所挑取基因之表現情形。

5. 蛋白質萃取、定量與酵素活性分析

5.1. 萃取葉鞘蛋白質以進行電泳分析

參考 Nakamura 等人 (1989) 之方法，進行葉鞘蛋白質萃取以進行定量分析

- (1) 取 1 g 葉鞘材料，在液態氮下以研鉢和杵研磨成粉末，加入 5X 體積萃取液 A (100 mM Tricine-NaOH, pH8、8 mM MgCl₂、2 mM ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA)、50 mM 2-mercaptoethanol、12.5% (v/v) glycerol、5% (w/v) polyvinylpyrrolidone-40 (PVP-40)) 混合均勻。
- (2) 在低溫下以 Miracloth membrane (Calbiochem, USA) 過濾萃取液，收集濾液。
- (3) 以 4°C、10,000 x g 離心 5 分鐘，把沉澱物與上清液分開。
- (4) 取 10 μL 上清液進行蛋白質濃度測定後 (Bradford, 1976)，取 30 μg 蛋白質將體積以萃取液 A 補到 100 μL，進行純化步驟。
 - (a) 加入等體積之 phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1) 混合均勻，以 4°C、13,250 x g 離心 15 分鐘後移除上清液，再重複一次。
 - (b) 加入 4X 體積冰冷 100% acetone 混合均勻，於 -20°C 沉澱隔夜或 -80°C 沉澱 4 小時。
 - (c) 再分別依序用 200 μL 之 100% methanol、80% acetone 及 100% acetone 清洗沉澱物，每次清洗間隔以 4°C、13,250 x g 離心 15 分鐘並丟棄上

清液。

(d) 以 4°C、13,250 x g 離心 15 分鐘並移除上清液，再真空抽氣 15 分鐘。

(e) 以 20 µL 1X Sample Buffer (125 mM Tris-HCl, pH6.8、2% SDS、2 mM EDTA、5% β-mercaptoethanol) 及 2 µL Tracking dye (1mg bromophenol blue、5 mL H₂O、5 mL glycerol) 溶解蛋白質。

(f) 於 100°C 煮沸 5 分鐘後放置冰上 10 分鐘，待冷卻進行 SDS 膠體電泳。

(5) 沈澱物部分 (包含澱粉粒及澱粉粒結合蛋白)

(a) 以 5 mL 萃取液清洗沉澱物兩次，每次以 4°C、10,000 x g 離心 5 分鐘並去除上清液。

(b) 將沉澱物溶解在 1 mL 的 1X Sample Buffer 中，於沸水中加熱 5 分鐘後放置冰上 10 分鐘。

(c) 以 4°C、15,000 x g 離心 10 分鐘，取 20 µL 上清液加入 2 µL Tracking dye，混合均勻後進行 SDS 膠體電泳。

5.2. 酵素活性分析

5.2.1. 萃取葉鞘蛋白質以進行酵素活性分析

依照上述方法將葉鞘蛋白質萃取出來，亦分成上清液與沉澱物部分：

(1) 上清液部分 (用來測定 AGPase、SSS、SBE、α-amylase 及 β-amylase 之酵素活性)

(a) 上清液以 4°C、10,000 x g 離心 5 分鐘後，吸取上清液至離心管中。

(b) 加入 4X 體積冰 100% acetone 混合均勻，於 -20°C 沉澱隔夜或 -80°C 沉澱 4 小時。

(c) 以 4°C、3,500 x g 離心 15 分鐘，移除上清液。

(d) 加入 1 mL 冰冷 80% acetone 懸浮沉澱物並吸到微量離心管中，再以 4°C、10,000 x g 離心 15 分鐘，移除上清液。

(e) 以 1 mL 萃取液 B (100 mM Tricine-NaOH, pH8、8 mM MgCl₂、2 mM EDTA、12.5% (v/v) glycerol、5% (w/v) PVP-40) 回溶沉澱物，其為總可

溶性蛋白質，取 10 μL 依上述方法進行定量，其於儲存在 -80°C 備用。

(2) 沈澱物部分 (用來測定 GBSS 酵素活性)

- (a) 以 5 mL 萃取液 B 清洗沉澱物兩次，每次均以 4°C 、 $10,000 \times g$ 離心 5 分鐘並去除上清液。
- (b) 再以 1 mL 萃取液 B 回溶沉澱物，混合均勻後取 50 μL 溶液經抽乾並秤量乾重，其餘儲存於 -80°C 備用。

5.2.2. ADP-glucose pyrophosphoylase (AGPase) 活性測定

參考 Nakamura 等人 (1989) 之方法，測定葉鞘中 AGPase 酵素活性

- (1) 取 200 μL 酵素萃取液，加入 850 μL 反應液 1 (100 mM HEPES- NaOH , $\text{pH}7.4$ 、5 mM MgCl_2 、1 mM adenosine 5'-diphosphate glucose (ADPG)、3 mM sodium pyrophosphate、4 mM dithiothreitol (DTT))。
- (2) 同時配製體積為 200 μL 之 G1P 標準液 (分別含有 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 μmole G1P)，加入 850 μL 反應液 1。
- (3) 於 30°C 反應 30 分鐘後，於 100°C 加熱 30 秒以終止反應。
- (4) 以 4°C 、 $7,840 \times g$ 離心 10 分鐘，取 1 mL 上清液至 1.5 mL 微量離心管中，加入 15 μL 10 mM NADP。
- (5) 在 340 nm 波長下讀取吸光度為 E1。
- (6) 再加入 5 μL 反應液 2，內含 0.4 U phosphoglucomutase (PGM) [Sigma, USA] 與 0.35 U G6PDH [Roche, Germany]，反應 10 分鐘後，在 340 nm 波長下讀取吸光值作為 E2。
- (7) 將 E2-E1 之數值帶入 G1P 標準曲線，推算出酵素活性。

5.2.3. Granule-bound starch synthase (GBSS) 活性測定

參考 Nishi 等人 (2001) 之方法，測定葉鞘中 GBSS 酵素活性

- (1) 取 200 μL 澱粉懸浮液 (含澱粉 5 mg)，加入 200 μL 反應液 1 (50 mM HEPES- NaOH , $\text{pH}7.4$ 、1.6 mM ADPG、16.7 mM DTT)。
- (2) 於 30°C 作用 30 分鐘，再以 100°C 水浴作用 30 秒終止反應。

- (3) 配製總體積為 400 μL 之 adenosine 5'-diphosphate (ADP) 標準液 (分別含有 0、0.04、0.08、0.12、0.16 μmole ADP)。
- (4) 再加入 100 μL 反應液 2 (50 mM HEPES-NaOH, pH7.4、10 mM phosphocreatine (PCr)、200 mM KCl、2 U creatine phosphokinase (CPK)[Sigma, USA])。
- (5) 於 30°C 作用 30 分鐘，再以 100°C 水浴加熱 30 秒終止反應。
- (6) 以 4°C、7,840 x g 離心 10 分鐘。
- (7) 吸取 400 μL 上清液至新的 1.5 mL 微量離心管，加入 700 μL 反應液 3 (50 mM HEPES-NaOH, pH7.4、20 mM MgCl_2 、10 mM glucose、2 U G6PDH[Roche, Germany]、2 mM NADP)，混合均勻後，吸取 1 mL 到測光管中。
- (8) 於 340 nm 波長下讀取吸光度為 E1。
- (9) 加入 5 μL HK (2 U) [Sigma, USA]，反應 5 分鐘後，於 340 nm 波長下讀取吸光度為 E2。
- (10) 將 E2-E1 之數值帶入 ADP 標準曲線，推算出酵素活性，所得數值再除上最初澱粉重。

5.2.4. Soluble starch synthase (SSS) 活性分析

參考 Nishi 等人 (2001) 之方法，測定葉鞘中 SSS 酵素活性。

- (1) 取 200 μL 酵素萃取液 (至少含粗蛋白 100 μg)，加入 200 μL 反應液 1 (50 mM HEPES-NaOH, pH7.4、1.6 mM ADPG、0.23% (w/v) glycogen、16.7 mM DTT)，於 30°C 作用 30 分鐘。
- (2) 於 100°C 水浴作用 30 秒以終止酵素反應。
- (3) 同時配製總體積為 400 μL 之 ADP 標準品 (分別含有 0、0.04、0.08、0.12、0.16 μmole ADP)。
- (4) 樣品和標準品均加入 100 μL 反應液 2 (50 mM HEPES-NaOH, pH7.4、10 mM PCr、200 mM KCl、2 U CPK[Sigma, USA])。
- (5) 於 30°C 作用 30 分鐘，再以 100°C 水浴加熱 30 秒以終止反應。
- (6) 以 4°C、7,840 x g 離心 10 分鐘。
- (7) 取 400 μL 上清液至新的微量離心管中，加入 700 μL 反應液 3 (50 mM

Hepes-NaOH, pH7.4、20 mM MgCl₂、10 mM glucose、2 U G6PDH[Roche, Germany]、2 mM NADP)。

- (8) 混合均勻後，吸取 1 mL 到測光管中，於 340 nm 波長下讀取吸光度為 E1。
- (9) 再加入 2 U HK[Sigma, USA]，混合均勻並反應 5 分鐘後，於 340 nm 波長下讀取吸光度為 E2。
- (10) 將 E2-E1 之數值帶入 ADP 標準曲線，推算出酵素活性。

5.2.5. Starch branching-enzyme (SBE) 酵素活性分析

參考 Guan 及 Preiss (1993) 之方法，測定葉鞘中 SBE 酵素活性

- (1) 取 200 μ L 酵素萃取液兩份 (至少含粗蛋白 100 μ g)，一份經過 100°C 加熱 5 分鐘變性，作為空白對照組。
- (2) 加入 650 μ L 100 mM Hepes-NaOH (pH7.4) 及 150 μ L potato starch (濃度為 1 mg/ mL)。
- (3) 混合均勻並於 30°C 作用 30 分鐘後，以 100°C 水浴加熱 30 秒以終止反應。
- (4) 加入 50 μ L 碘液 (0.1% I₂、1% KI) 並混合均勻，使樣品顏色變為淡紫色。
- (5) 偵測 600 nm 波長下之吸光值，將樣品吸光值扣掉空白對照組後計算活性 (每分鐘增加一個 OD 值為一個活性單位)。

5.2.6. α -amylase 酵素活性分析

參考 Megazyme 公司的操作手冊 (ALPHA-AMYLASE ASSAY PROCEDURE-CERALPHA METHOD)，進行 α -amylase 酵素活性測定：以一個阻礙非還原端被外切酵素 (例如: β -amylase、amyloglucosidase 與 α -glucosidase) 作用的反應物 (non-reducing-end blocked *p*-nitrophenyl maltoheptaoside ; BPNPG7) 來進行反應，其被 α -amylase 酵素作用後生成 Blocked maltosaccharide 與 *p*-nitrophenyl maltosaccharide，而 *p*-nitrophenyl maltosaccharide 再經由 α -glucosidase 作用後可生成自由態 *p*-nitrophenyl，偵測 *p*-nitrophenyl 在 OD₄₁₀ 的吸光度再依照公式換算 α -amylase 酵素活性。

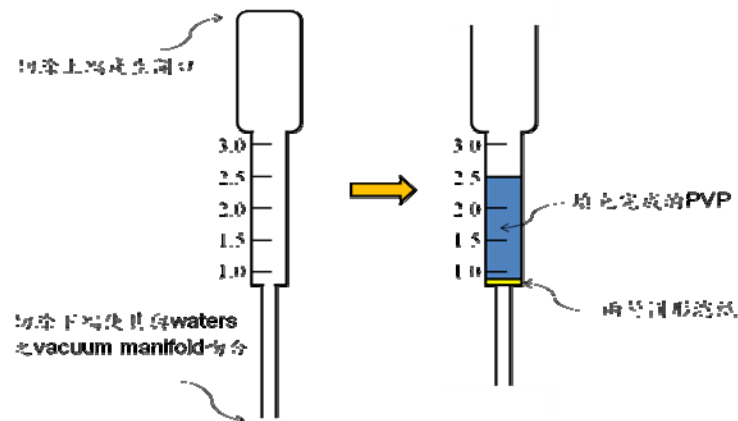
5.2.7. β -amylase 酵素活性分析

參考 Megazyme 公司的操作手冊 (BETA-AMYLASE ASSAY PROCEDURE-BETAMYL METHOD)，進行 β -amylase 酵素活性測定：以 *p*-nitrophenyl- α -D-maltopentaoside (PNPG5) 當做反應物，其可以被 β -amylase 快速水解成 maltose 及 *p*-nitrophenyl- α -D-maltotrioside，而 α -amylase 對 PNPG5 的作用速度非常慢，*p*-nitrophenyl- α -D-maltotrioside 再經由 α -glucosidase 作用後可生成自由態 *p*-nitrophenyl，使用高 pH 值之 Trizma base solution 停止反應後，偵測 *p*-nitrophenyl 在 OD₄₀₀ 的吸光度再依照公式換算 β -amylase 酵素活性。

6. ABA 萃取與含量分析

參考 Hurng 等人 (1994) 之方法，測定葉鞘中 ABA 含量

- (1) 收取水稻葉鞘 15-20 mg 秤量鮮重後，用研鉢及杵在液態氮下研磨至粉狀。
- (2) 待樣品回溶後，加入 1.5 mL 80% (v/v) methanol (含 2% glacial acetic acid)，混合均勻後於 4°C 黑暗下作用 1 小時以上。
- (3) 以室溫、2,000 x g 離心 10 分鐘。
- (4) 取 1 mL 上清液至 1.5 mL 微量離心管中，真空乾燥後放置 4°C 黑暗中備用。
- (5) 於真空乾燥過程中，同時製作 PVP column
 - (a) 以刀片將塑膠滴管的前後端削去適當長度，讓前端可吻合抽氣系統開口，後端只需要切出開口即可。
 - (b) 將適量 PVP 粉末溶於 dH₂O 中並攪拌數次，撈除浮於水面之顆粒物。
 - (c) 以打洞機製做圓形 3M Filter Paper，並在塑膠滴管中裝入兩層 Filter Paper 後，將塑膠滴管架設在抽氣系統上。
 - (d) 一邊緩慢抽氣，一邊由上端開口加入 PVP 液體，製做高度約為 2.5-3 mL 即可，待 PVP 溶液中的 dH₂O 流出後，即完成 PVP column。



- (6) 乾燥後的樣品加入 0.5 mL 100% methanol，再加入 0.5 mL 0.2 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (pH6.8)，震盪使其完全溶解後，靜置於 4°C 黑暗 10 分鐘。
- (7) 將溶解後的樣品通過 PVP column，並收集濾液。
- (8) 待濾液完全抽乾後，以 6 mL dH_2O 沖洗 PVP column，並收集濾液。
- (9) 在濾液中加入 100 μL glacial acetic acid，共得實際濾液約 7 mL。
- (10) 先用 5 mL 100% methanol 過濾 C_{18} column，再用 4 mL dH_2O 過濾 C_{18} column。
- (11) 將步驟 9 的濾液通過 C_{18} column 並完全將濾液抽乾後，丟棄濾液。
- (12) 加入 4 mL 清洗液 (20% ethanol 及 2% glacial acetic acid)，注意流量不超過每分鐘 1.5 mL，並將濾液完全抽乾後，丟棄濾液。
- (13) 以 4 mL 萃取液 (55% ethanol 及 2% glacial acetic acid) 將樣品洗出，注意流量不超過每分鐘 1.5 mL，並將濾液完全抽乾，收集濾液。
- (14) 將濾液真空乾燥後存放在 4°C 或 -20°C、黑暗下。
- (15) 參考 Agdia 公司操作手冊 (Phytodetek® ABA Test Kit)，利用抗體免疫法進行 ABA 含量測定。

7. 啟動子鈎取及序列分析

7.1. 啟動子鈎取

以 plant DNA_{ZOL}® Reagent (Invitrogen, USA)：植物組織為 0.3 mL：0.1 g 之比例萃取水稻基因組 DNA 後，進行聚合酶連鎖反應。

針對目標基因啟動子序列設計專一性引子 (表六)，並於適當的黏合溫度下以具有 3'→5' exonuclease 活性的 Phusion DNA Polymerase [FINNZYMES, Finland]進行啟動子片段的擴增。基因組 PCR 反應以總體積 20 µL 進行 (500 ng Genomic DNA template、1X Phusion HF Buffer、0.2 mM dNTPs、0.5 µM forward primer、0.5 µM reverse primer、0.4U Phusion DNA Polymerase [FINNZYMES, Finland])，程序條件設定如下所示：98°C 反應 30 秒，然後進入 40 個循環的 PCR 反應，每一個循環的溫度為 98°C/10 秒，適當的黏合溫度/30 秒，72°C/30-45 秒 (30 秒/1 kb)，最後以 72°C 進行反應 10 分鐘。

Os*SUT1* 基因位在 chromosome 3 上，利用 PSUT1-F1、R5; F4、R6; F5、R4 三組引子分別擴增長度為 903、1076、191 bp 三個啟動子片段 (表六)，再利用二次 PCR 擴增出 1959 bp 之全長啟動子，以轉譯起始點 ATG 的 A 為+1，所擴增出的啟動子位置位在 ATG 上游-10~-1968 之區域 (圖十五)。Os*SUT2* 基因位在 chromosome 12，利用 PSUT2-F1、R2 引子擴增長度為 830 bp 啟動子片段 (表六) (圖十六)，擴增範圍在-1~-830 的區域。Os*SUT4* 基因位在 chromosome 2，利用 PSUT4-F1、R4 引子擴增長度為 833 bp 啟動子片段 (表六) (圖十七)，其位置位在 ATG 上游-11~-843 的區域。擴增之 Os*SUT2* 及 4 基因啟動子接到 pGEM-T easy vector 後，送基隆米克斯公司定序，而 Os*SUT1* 因為使用 blunt end 之 Taq DNA polymerase 所合成，故直接以 PCR 產物送定序。

7.2. 啟動子序列分析

利用NCBI網站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 搜尋水稻葉鞘中調控醣類代

謝及運輸關鍵基因之啟動子序列，由轉譯起始碼 (start codon) 往上游 1500 核苷酸片斷定義為啟動子區域，利用 Plant *Cis*-Acting Regulatory DNA Elements (PLACE) (Higo et al., 1999) 網站 (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) 找尋啟動子上 *cis*-acting elements。

8. 以暫時性表現系統進行啟動子活性分析

8.1. 建構暫時性表現載體

以接有 *OsSUT2*、4 基因啟動子之 pGEM-T easy vector 做為模板，而 *OsSUT1* 以 PCR 產物當作模板，設計帶有限制酵素切位之專一性引子: PSUT1-F1-*SacI*/PSUT1-R4-*SmaI*、PSUT2-F1-*SacI*/PSUT2-R2-*SmaI* 與 PSUT4-F1-*SacI*/PSUT4-R4-*SmaI* (表六)，進行 PCR 反應，分別合成長度為 1959 bp、830 bp 與 833 bp 之啟動子，再將這些啟動子利用 *SacI* 與 *SmaI* 切位接在不含 intron 之 β -glucuronidase (*GUS*) 基因之前 (圖十九)，分別命名為 PSUT1-DF(-1968/-10)::*GUS*、PSUT2-DF(-830/-1)::*GUS* 與 PSUT4-DF(-843/-11)::*GUS*。另外，將三個啟動子接在含有 intron 之 *GUS* 基因之前 (附錄六)，命名為 PSUT1-DF(-1968/-10)::Ubint::*GUS*、PSUT2-DF(-830/-1)::Ubint::*GUS* 與 PSUT4-DF(-843/-11)::Ubint::*GUS* (圖二十)，接好之質體 DNA 再以 *SacI* 與 *SmaI* 兩限制酵素作用後進行電泳分析，確定片段無誤後定序以確定載體構築成功。

8.2. 建構 *OsSUT4* 基因不同長度啟動子暫時性表現載體

設計 PSUT4 上專一性引子：PSUT4-DF2-*SacI*、PSUT4-DF2a-*SacI*、PSUT4-DF3-*SacI*、PSUT4-DF3a-*SacI*、PSUT4-DF4-*SacI*、PSUT4-DF5-*SacI*、PSUT4-DF6-*SacI*、PSUT4-DF7-*SacI* 與 PSUT4-R4-*smaI* (表七)，以 PSUT4-DF(-843/-11)::Ubint::*GUS* 質體 DNA 當作模板，進行 PCR 反應 (PCR

條件與上述合成 *OsSUTs* 基因啟動子之條件相同)，分別合成出 633、592、540、473、424、318、238 及 129 bp 之 5'端 deletion 啟動子片段，合成出片段以 *SacI* 及 *SmaI* 限制酵素作用後，接於含有 intron 之 *GUS* 基因之前 (圖二十二) 並送定序確認無誤。

8.3. 抽取使用於基因槍射擊的質體 DNA

參考 QIAGEN Plasmid Purification Handbook，抽取高純度質體 DNA 進行基因槍暫時性表現分析。

8.4. 微攜帶子 (microcarrier) 的準備與 DNA 包覆

根據 Sanford 等人 (1993) 的方法，準備基因槍射擊用的微攜帶子(鎢粒子)

- (1) 秤取 60 mg 鎢粒子 (Bio-Rad, USA) 於 1.5 mL 的微量離心管中，加入 1 mL 100% ethanol 後，強力振盪 10 分鐘。
- (2) 以桌上型微量離心機離心 5 秒，使鎢粒子沉澱。
- (3) 移除上清液，加入 1 mL 無菌水清洗，強力振盪 1 分鐘後室溫靜置 1 分鐘。
- (4) 再以微量離心機離心 5 秒，使鎢粒子沉澱。
- (5) 移除上清液後重複步驟 3-4 二次。
- (6) 加入 1 mL 滅過菌之 50% glycerol，使最終濃度達 60 mg/mL，每 50 μ L 分裝於 1.5 mL 微量離心管中，使每管微攜帶子含量為 3 mg，保存於 -20°C 備用。
- (7) 將 6 μ g 啟動子暫時性表現質體 DNA 與 6 μ g pAHC18 質體 DNA (附錄三) 在 1.5 mL 離心管中混合均勻。
- (8) 將製備好之鎢粒子強力振盪，使鎢粒子均勻散布在溶液中。
- (9) 一邊以 Scientific Industries vortex-genie 2 機型之 level 6 強度進行振盪，一邊緩速且依序加入步驟 1 混合均勻的質體 DNA、50 μ L 1M CaCl_2 及 20 μ L 0.1M spermidine (需新鮮配製) 後，持續振盪 1 分鐘。

- (10) 於室溫靜置5分鐘。
- (11) 以微量離心機離心2秒使鎢粒子沉澱後，以pipetman小心移除上清液。
- (12) 加入100 μ L 70% ethanol後並立即以pipetman小心移除上清液。
- (13) 加入140 μ L 100% ethanol，以低速振盪2-3秒使鎢粒子懸浮，即製備完成。

8.5. 基因槍射擊

- (1) 將巨攜帶子 (macrocarriers)、巨攜帶子支撐物 (macrocarrier holder)、破裂圓盤 (rupture disk)、破裂圓盤保持蓋 (rupture disk retaining cap)、微攜帶子送出組 (microcarrier launch assembly) 及停止屏 (Stopping screen) 以 70% ethanol 滅菌後，放置無菌操作台吹乾，將 macrocarriers 裝載在 macrocarrier holder 上。
- (2) 將帶有DNA的鎢粒子平均塗抹於macrocarriers/macrocarrier holder上。
- (3) 打開氮氣筒氣閥，確定氮氣筒壓力保持大於粒子撞擊衝破圓盤所需壓力 200 psi左右。
- (4) 打開PDS-1000/HE基因槍 (Bio-Rad, CA) 電源開關，以70% ethanol消毒基因槍內壁。
- (5) 將消毒過之rupture disk置入rupture disk retaining cap中，放置於氣體加速管末端，以專用扳手 (torque wrench)鎖緊。
- (6) 將macrocarriers與stopping screen置入microcarrier launch assembly中。
- (7) 將microcarrier launch assembly與目標細胞置入射擊腔適當位置，把門關上後將射擊腔抽真空，當真空度達26-27 inch-Hg時，快速壓住Hold鈕使壓力固定。
- (8) 一直壓住Fire 鈕直到破裂圓盤破掉且壓力值達零才放開。

8.6. 萃取水稻葉鞘蛋白質

參考 Shen (1996) 等人之方法，萃取水稻葉鞘蛋白質以及進行 GUS 及 Luciferase 活性分析

- (1) 使用 KURABO SH-100 均質機及 5 mm 鋼珠，以 1,400 rpm、30 秒兩次之條件將葉鞘撞擊成粉狀。
- (2) 加入 1 mL 萃取液 (100 mM NaPO₄, pH7、5 mM DTT、3 mg leupeptin、50% (v/v) glycerol) 混合均勻。
- (3) 以 4°C、13,250 x g 離心 10 分鐘。
- (4) 將上清液吸到新的離心管中，分別吸取 100 μL 進行 Luciferase 及 GUS 酵素活性測定，其他保存在-20°C 中。

8.7. Luciferase 活性測定

- (1) 先配製 2X Luciferase Assay Buffer (LAB) 儲存液 (60 mM Tris-SO₄, pH7.7、20 mM MgCl₂、20 mM DTT、2 mM EDTA)，放置-20°C 備用。
- (2) 準備 1 X LAB + 0.5 mM Luciferin (100 μL/sample，每次至少配製 3 mL)，置冰上且避光。
- (3) 再配製 2 X LAB+2 mM ATP (100 μL/sample)，配製完放置冰上備用。
- (4) 將 1 X LAB+0.5 mM Luciferin 注入到 Lumat LB 9507 冷光儀之 inject1 管子中，吸取 100 μL 2 X LAB+2 mM ATP 至測量玻璃試管底部，再加入 100 μL 樣品液，混合均勻後測定冷光強度。

8.8. GUS 活性測定

- (1) 吸取 100 μL 萃取液到微量離心管中，加入 200 μL GUS Assay Buffer (2.5 mM 4-methylumbelliferyl β-D-glucuronide (MUG)、50 mM NaPO₄, pH7、10 mM EDTA、10 mM DTT、20 μg/mL leupeptin、20% (v/v) methanol、0.02%

sodium azide), 混合均勻。

(2) 於 37 °C 培養 20 小時。

(3) 加入 800 μ L Carbonate Stop Buffer (0.2M Na₂CO₃, pH11.2) 終止反應。

(4) 分別取 200 μ L 標準品及樣品液至微量測試盤 (Labsystem CLINIPLATE) 小槽 (well) 中, 使用 Labsystems Fluoroskan Ascent FL (Type374) 螢光測量儀測定螢光強度 (Filter : Excitation 355 nm , Emission 460), 將機器所得數值直接除以 Luciferase 數值, 得到 GUS 相對表現量。

9. Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA)

參考Panomics操作手冊 (EMSA "Gel Shift" Kit), 進行細胞核蛋白與PSUT4 啟動子片段的結合分析

9.1. 製備 DNA 探針

分別利用 PSUT4-DF3-Biotin、PSUT4-DR3 與 PSUT4-DF2-Biotin、PSUT4-DR2 兩對引子 (表七), 以 PSUT4-DF(-843/-11)::Ubint::GUS 質體 DNA 當作模板, 進行 PCR 反應合成具有 Biotin 標定的 DNA 探針, 分別命名為 DF(-550/-484) (67 bp) 與 DF(-643/-603) (41 bp) (圖二十四)。利用 PSUT4-DF3、PSUT4-DR3 與 PSUT4-DF2、PSUT4-DR2 兩對引子合成沒有 Biotin 標定的 DNA 片段, 分別當做 DF(-550/-484) 與 DF(-643/-603) 的競爭者。

9.2. 利用 polyacrylamide gel 純化 DNA 探針

(1) 製做 1.5 mm 厚度 5% Non-denaturing polyacrylamide gel (2 mL 5X tris-borate/ethylenediamine tetra-acetic acid (TBE)、2.5 mL 40% Acrylamide/Bis、0.625 mL 80% glycerol、0.02 mL tetramethylethylenediamine (TEMED)、14.58 mL dH₂O、0.3 mL 10% ammonium persulfate)。

- (2) 待膠體凝固後，置於 0.5 X TBE Transfer Buffer 中。
- (3) 將 DNA probe 加入 1/10 體積的 10X DNA loading dye，混合均勻後 loading 到 well 中。
- (4) 以 100 V 進行電泳 45 分鐘。
- (5) 電泳完畢後將膠體移到含有 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EtBr 之 0.5X TBE 中，於室溫下搖晃 20~30 分鐘。
- (6) 在長波長 (312 nm) 的 UV 燈下對照 DNA marker，將含有 DNA 探針的膠體切下，放置於微量離心管中。
- (7) 以可拋棄的微量吸管頭搓碎微量離心管中的膠體。
- (8) 加入 2X 體積的 Acrylamide Gel Elution Buffer (0.5 M ammonium acetate、10 mM magnesium acetate、1 mM EDTA, pH 8.0、0.1% SDS) 混合均勻後，於 37°C 震盪培養隔夜。
- (9) 以 4°C、13,230 x g 離心 1 分鐘，將上清液移到新的微量離心管中。
- (10) 再加入 0.5X 體積的 Acrylamide Gel Elution Buffer 到原先的離心管中，短暫震盪令 Buffer 與膠體充分混合。
- (11) 以 4°C、13,230 x g 離心 1 分鐘，將上清液與步驟 9 的上清液收集在同一離心管中。
- (12) 將上清液通過 0.45 μm 之過濾膜，以去除殘留膠體。
- (13) 收集濾液，於 4°C 中加入 2X 體積的 100% ethanol 後放置冰上 30 分鐘。
- (14) 以 4°C、13,230 x g 離心 10 分鐘，移除上清液。
- (15) 先以 200 μL TE buffer (pH8.0) 溶解 DNA，再加入 25 μL 3M sodium acetate (pH5.2)。
- (16) 以 2X 體積 100% ethanol 再沉澱 DNA 一次。
- (17) 以 70% ethanol 潤洗沉澱物，離心乾燥後以 50 μL Tris-EDTA (TE) buffer (pH8.0) 回溶 DNA。

(18) 取 2 μL 進行定量，並將 DNA 濃度調整為 10 ng/ μL 後儲存於 -20°C 備用。

9.3. 葉鞘核蛋白萃取

參考Panomics操作手冊 (Nuclear Extraction Kit)，進行水稻葉鞘核蛋白萃取

- (1) 將 0.5 g 葉鞘組織，以均質機打擊 6 秒 (轉速 13,000 rpm) 後放置冰上。在冰上加入 1 mL Buffer A working Reagent (0.96 mL 1X buffer A、10 μL 100 mM DTT、10 μL protease inhibitor、10 μL phosphatase inhibitor I、10 μL phosphatase inhibitor II)。
- (2) 再以均質機打擊 6 秒 (轉速 13000 rpm) 後，放置冰上 15 分鐘。
- (3) 以 4°C 、850 $\times g$ 離心 10 分鐘，丟棄上清液。
- (4) 在冰上加入 1 mL 新鮮 Buffer A working Reagent，以均質機敲打 6 秒後，放置冰上 15 分鐘。以 4°C 、1,400 $\times g$ 離心 3 分鐘，移除上清液並將沉澱物放置冰上。
- (5) 加入 150 μL 的 Buffer B working Reagent (145.5 μL 1X buffer B、1.5 μL protease inhibitor、1.5 μL phosphatase inhibitor I、1.5 μL phosphatase inhibitor II)，並用最快速度震動 10 秒。
- (6) 將離心管放置冰上 60 分鐘，每 20 分鐘溫和搖晃一次。
- (7) 以 4°C 、1,400 $\times g$ 離心 5 分鐘後，將上清液移到乾淨的離心管中。
- (8) 取 2 μL 進行蛋白質定量，其於儲存在 -80°C 備用。

9.4. 形成 DNA-Transcription factor (DNA-TF)複合物

- (1) 標準流程:在 0.2 mL 微量離心管中依序加入 1 μL Nuclear Extract (5~10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)、1 μL poly d(I-C) (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)、2 μL 5X binding Buffer、5 μL nuclease-free water，混合均勻後在室溫放置 5 分鐘。加入 1 μL labeled TF probe (10 ng/ μL)，混合均勻後於 15°C 培養 30 分鐘。
- (2) 競爭型流程:在 0.2 mL 微量離心管中依序加入 1 μL Nuclear Extract (5~10

$\mu\text{g}/\mu\text{L}$)、 $1 \mu\text{g}$ poly d(I-C)、 $2 \mu\text{L}$ 5X binding Buffer、適量 nuclease-free water，混合均勻後在室溫放置 5 分鐘。分別加入 0、0.5 及 $1 \mu\text{L}$ cold (unlabeled) TF probe (濃度為 $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$)，總體積為 $9 \mu\text{L}$ ，混合均勻後在室溫放置 5 分鐘。加入 $1 \mu\text{L}$ labeled TF probe ($10 \text{ ng}/\mu\text{L}$) 混合均勻，混合均勻後於 15°C 培養 30 分鐘。

9.5. Non-denaturing polyacrylamide gel 電泳

- (1) 準備 5% Non-denaturing polyacrylamide gel，浸於預冷過之 0.5X TBE 中。
- (2) 先於 4°C 中以 100 V 進行電泳 10 分鐘。
- (3) 電泳完畢後以微量吸管清洗樣品槽。
- (4) 將樣品與 $1 \mu\text{L}$ loading dye 混合均勻後注入樣品槽中。
- (5) 在 4°C 中以 100 V 進行電泳，直到 dye 到達離底部 0.5 公分的距離為止。

9.6. DNA-TF 複合物轉印及 UV-Crosslinking

- (1) 電泳完畢後，將一張乾的 3MM 濾紙蓋在 gel 上，gel 會貼附於 3MM 濾紙上，小心從玻璃板上移開濾紙與 gel。
- (2) 將 gel 浸放在 0.5X TBE 中，於室溫搖晃 15 分鐘。
- (3) 準備一片與 gel 大小相同的 Neutrally Charged Nylon Membrane ($0.45 \mu\text{m}$) 及兩片 3MM 濾紙分別浸泡於 0.5X TBE 中。
- (4) 移開 Bio-Rad Trans-Blot SD 半乾式轉漬槽之安全蓋及不鏽鋼負極板。
- (5) 依序在正極板上放置預先浸濕的濾紙、Nylon Membrane、gel 與另一張濾紙，每放置一層時需移除所有氣泡。
- (6) 蓋上負極板，放上安全蓋且連接電線於電源供應器上，以 24 V 進行轉印 30 分鐘。
- (7) 轉印完畢之後，將 Nylon Membrane 放置在 3MM 濾紙上，貼近 gel 的面朝

上，以 XL-1000 UV crosslinker 進行 crosslinking 3 分鐘。

9.7. Immobilization 與 Detection

- (1) 將 Nylon Membrane 移到含有 15 mL 1X Blocking Buffer 的盒子中，在室溫中搖晃 15 分鐘。
- (2) 從盒中取出 1 mL 1X Blocking Buffer 移到乾淨的微量離心管中，加入 15 μ L Streptavidin- horseradish peroxidase (HRP) 並 vortex 10 秒鐘。
- (3) 將稀釋好之 Streptavidin-HRP 加到盒子中，與原來的 Blocking Buffer 混合均勻，在室溫下搖晃 15 分鐘。
- (4) 將含有 Streptavidin-HRP 之 Blocking Buffer 倒出，以 15 mL 1X Wash Buffer 在室溫下搖晃清洗 Nylon Membrane 三次，每次 8 分鐘。
- (5) 以 15 mL 1X Detection Buffer 置換 Wash Buffer，在室溫搖晃培養 5 分鐘。
- (6) 將 Nylon Membrane 放置在兩片塑膠薄片，將上面的塑膠片翻開，加入 0.5 mL Substrate Solution (50 μ L Solution I、50 μ L Solution II、400 μ L Solution III) 到 Nylon Membrane 上，並完全覆蓋 Nylon Membrane。
- (7) 輕壓塑膠片擠出過多的 Substrate Solution 後，於室溫培養 5 分鐘。
- (8) 利用 X-ray film 壓片 2 小時進行影像呈現。

10. 以穩定性表現系統進行啟動子活性分析

10.1. 建構 PSUT4 不同長度啟動子穩定性表現載體

將建構完成的 *OsSUT4* 基因之不同長度啟動子暫時性表現載體以 *SacI* 與 *HindIII* 兩限制酵素切下，其中包含啟動子片段、ubi 1st intron、*GUS* 基因及 3'HVA22 部分，再接到穩定性表現載體 pCambia1302 上，建構好之載體再以 *SacI* 與 *HindIII* 作用，確認載體構築完成 (圖二十七)。

10.2. EHA105 農桿菌勝任細胞之製備與轉型

- (1) 從 YEP 固體培養基 (1% bactopectone、1% yeast extract、0.5% sodium chloride、1.5% agar) 上挑選 EHA105 單一菌落，培養於 3 mL YEP 液體培養基中 (1% bactopectone、1% yeast extract、0.5% sodium chloride)。
- (2) 於 28°C 震盪培養 2 天。
- (3) 取 1 mL 菌液加到 50 mL YEP 液體培養基內，於 28°C 震盪培養直到 $OD_{600} = 0.5 \sim 1$ 。
- (4) 將菌液倒入事先預冷的離心管中，以 4°C、3,829 x g 離心 7 分鐘。
- (5) 除去上清液後加入 200 mL 預冷之無菌水，混合均勻以 4°C、3,829 x g 離心 7 分鐘。
- (6) 除去上清液後加入 40 mL 冰冷 10% glycerol，混合均勻以 4°C、1,378 x g 離心 20 分鐘。
- (7) 去除上清液，加入 3 mL 冰冷 10% glycerol 並混合均勻，以 40 μ l 分裝於微量離心管中，保存於 -80°C 備用。
- (8) 將 EHA105 勝任細胞放置冰上溶解，同時預冷電穿孔專用 cuvette。
- (9) 取 2 μ L 質體 DNA，加到勝任細胞中並混合均勻。
- (10) 將 cuvette 放於 Electroporation Apparatus (Bio-Rad) 中，選擇 "Agro" 模式，按下 "pulse"。
- (11) 將菌液重新懸浮於 1 mL YEP 液體培養基，於 28°C 震盪培養 30-60 分鐘。
- (12) 將菌液畫線於含有 50 μ g/mL Kanamycin 之 YEP 固體培養基上，於 28°C 培養 48 小時。

10.3. 誘導癒傷組織

- (1) 收取 TNG67 水稻乳熟期至糊熟期間的未成熟種子 (約為抽穗後 10~15 天)，於室內晾乾後儲藏於 4°C 冰箱備用。

- (2) 取10-15顆種子去掉內外穎，以消毒水 (2% NaOCl₄及一滴Tween-20) 消毒30分鐘。
- (3) 於無菌操作台內以滅菌水沖洗4-5次，完全清除消毒水為止。
- (4) 將種子平躺在誘導癒傷組織的CIM固體培養基 (附錄四) 上，以3M透氣膠帶封邊後，放置27°C全光照培養室培養4-6星期。
- (5) 挑取由胚盤衍生出之癒傷組織於新的CIM固體培養皿上，經過2-3星期後，選取直徑2-5 mm之癒傷組織進行轉殖。

10.4. 水稻基因轉殖 (Hiei et al, 1994, Toki, 1997)

- (1) 取轉型成功之農桿菌單一菌落培養於3 mL YEP液體培養基中(含50 µg/mL Kanamycine)，在28°C震盪培養2-3天。
- (2) 取0.5 mL菌液到50 mL AB培養基中 (附錄四) (含50 µg/mL Kanamycine)，於28°C震盪培養，每隔一段時間測定OD₆₀₀數值，直到0.8-1.0為止。
- (3) 以4°C、3,840 x g 離心7分鐘後，完全去除上清液，加入10 mL MS液態培養基 (附錄四)，使菌體懸浮於在培養基中，並倒入petri dish中。
- (4) 將水稻癒傷組織完全浸於菌液中，再取出培養於2N6AS 固體培養基中 (附錄四)，在27°C黑暗中共培養2-3天。
- (5) 收集癒傷組織以無菌水清洗3-5次，再以MS培養基清洗3-5次，最後以含有250 µg/mL Cefotaxime的MS Medium進行洗滌，每小時洗一次，直到澄淨。
- (6) 將癒傷組織移到含有50 µg/mL hygromycin 和 250 µg/mL cefotaxime 的篩選培養基上，在27°C全光照培養室中培養，約3-6週後可以得到癒傷組織。
- (7) 將癒傷組織移到PM固體培養基上 (附錄四)，在培養室中處理7-10天。
- (8) 將癒傷組織移到RM培養基上 (附錄四)，在27°C全日照培養室中培養3-5週，即可得到轉殖水稻幼苗。
- (9) 將水稻幼苗移至MS固體培養基 (附錄四) 中促進發根。

(10) 3週後水稻幼苗即可出瓶，待進行馴化後即可種植到盆中。

10.5. GUS 活性染色分析

參考 Jefferson (1987) 與 Hu (1990) 的方法，進行 GUS 染色分析

- (1) 置入染色液 (0.1 M NaPO₄ buffer, pH7.0、10 mM EDTA, pH7.0、0.5 mM potassiumferricyanide、0.5 mM potassiumferrocyanide、1 mM X-glucuronide、0.1% Triton X-100) 中，經 25 inch-Hg 真空抽氣 10 分鐘後，於 37°C 培養箱 16-24 小時。
- (2) 依序以 25%、50%、75%及 95% ethanol 脫去葉綠素後進行觀察。

10.6. 分析轉殖水稻GUS活性

依照上述方法萃取葉鞘蛋白質並利用 Bradford dye 測定蛋白質濃度後，取 100 μL 測量 GUS 活性：

- (1) 吸取 100 μL 萃取液到微量離心管中，加入 200 μL GUS Assay Buffer 並混合均勻，於 37 °C 培養 20 小時。
- (3) 加入 800 μL Carbonate Stop Buffer (0.2M Na₂CO₃, pH11.2) 終止反應。
- (4) 配製 7-hydroxy-4-methylcoumarin (MU) 標準品 (分別含有 0、200、400、600、800 及 1000 nM 之 MU)。
- (5) 分別取 200 μL 標準品及樣品液至微量測試盤之小槽中，使用 Labsystems Fluoroskan Ascent FL (Type374) 螢光測量儀測定螢光強度，再計算出每單位蛋白質 GUS 活性。

11. 統計分析

利用學生式 t-test 軟體，計算澱粉含量變化與澱粉合成相關基因之相關性與其間是否呈現顯著性差異。

結 果

1. 葉鞘中澱粉合成、澱粉分解與蔗糖轉運蛋白基因於抽穗期間之表現

1.1. 水稻上位葉葉鞘在抽穗期間其澱粉與可溶性醣類含量變化

收取抽穗前 20 天至抽穗後 20 天之 TNG67 水稻劍葉下第一 (-1)、第二 (-2) 與第三葉 (-3) 葉鞘 (圖一 d)，每隔 5 天採收一次，以酵素分析法進行澱粉含量測定。在這段期間，-2 葉葉鞘中的澱粉在抽穗前 5 天開始快速累積，並且於抽穗當天達到最高量，抽穗後又快速下降 (圖二 a)。另外由碘液染色的結果亦顯示，澱粉粒在抽穗前大量累積在葉鞘維管束周圍的薄壁細胞中，而抽穗後澱粉粒明顯變少 (圖二 b)。而於-1 及-3 葉葉鞘中也觀察到相似-2 葉葉鞘之澱粉含量變化趨勢，但並沒有-2 葉葉鞘明顯，且在此分析時期間，-3 葉葉鞘中的澱粉量遠低於-1 及-2 葉葉鞘 (圖二 a)。由澱粉含量變化的結果顯示，水稻上位葉葉鞘中-2 葉葉鞘為抽穗期間最主要的澱粉暫存組織。

除了-2 葉葉鞘中澱粉含量在抽穗期間的變化，我們也觀察抽穗期間葉鞘中可溶性醣類的變化趨勢，收集抽穗前 9 天到抽穗後 9 天之水稻-2 葉葉鞘，每隔三天收取材料一次，以酵素分析法測定其中澱粉、蔗糖及葡萄糖之含量變化。結果顯示澱粉累積最大量的時間在抽穗前 6 天 (圖三)，而蔗糖與葡萄糖含量於採收材料期間，均在抽穗後時期有上升的趨勢，蔗糖於抽穗後 6 天之含量最高，而葡萄糖則一直持續上升至抽穗後 9 天 (圖三)，此分析結果顯示抽穗之後澱粉降解成葡萄糖之同時，蔗糖亦在葉鞘中漸進合成。

1.2. 移除幼穗之水稻其葉鞘澱粉含量於抽穗期間之變化

為了探討水稻-2 葉葉鞘於抽穗後之澱粉降解過程，是由葉鞘本身生長發育之調控或是與儲藏組織碳源需求 (sink demand) 有關，我們於抽穗前 5 天將水稻幼穗從劍葉葉鞘中移除，並且觀察-2 葉葉鞘在抽穗前 7 天至抽穗後 20 天之澱粉含量變

化。如圖四所示，對照組 (未去除幼穗)-2 葉葉鞘中的澱粉於抽穗當天達到最大量後，隨著幼穗抽出而開始一路降解，如將幼穗移除，則-2 葉葉鞘中澱粉累積期會增長，故延遲-2 葉葉鞘澱粉含量下降的時間。於移除幼穗 15 天後，-2 葉葉鞘中的澱粉含量達到最高峰，其澱粉累積量更高於對照組水稻在抽穗當日的澱粉含量 (圖四)，此結果證明-2 葉葉鞘中的澱粉降解反應之發生與抽穗時間具有高度相關性。

1.3. 澱粉合成相關基因在葉鞘儲存-供源轉變期間之表現

為探討調控水稻抽穗期間澱粉含量變化之分子機制，採收抽穗前 20 天至抽穗後 20 天-2 葉葉鞘材料，並將葉鞘縱剖成相等兩部份，一部份利用酵素法進行澱粉含量測定，另一部份分析澱粉合成相關基因之表現。針對 ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase)、granule-bound starch synthase (GBSS)、soluble starch synthase (SSS)、starch branching enzyme (SBE)/ debranching enzyme (DBE) 四群酵素，利用專一性引子 (表一) 並以 real-time RT-PCR 方法進行 17 個澱粉合成相關基因之表現分析。分析結果顯示，*GBSSI* 及 *SSSII-3* 兩基因於葉鞘中的表現量極低，故沒有進行進一步之分析，而其他基因之 mRNA 表現量與澱粉含量變化進行相關性分析後，顯示其中有六個基因：*AGP-L2*、*GBSSII*、*SSSI*、*SBEI*、*SBEIII* 及 *SBEIV* 與-2 葉葉鞘中的澱粉含量變化呈現高度相關性 (表二)，其相關系數 (r 值) 分別為 0.88、0.88、0.69、0.84、0.86 及 0.81，推測此六個基因極有可能為主要影響水稻抽穗前，葉鞘中澱粉累積量之主要基因。此外，可將這些澱粉合成相關基因依其表現先後順序區分成三群：(一) 早期表現基因，於抽穗前 20 天即大量表現，之後隨著時間而持續降低表現量，包含 *GBSSII*、*SSSI* 及 *SSSII-1*；(二) 中期表現基因，於抽穗前 20 天具有中度表現量，直到抽穗前 10 天表現量達到高峰，接近抽穗時間表現量又再下降，其中包括 *AGP-L2*、*AGP-SI*、*SSSIII*、*SSSIV-1* 與 *SSSIV-2*；(三) 晚期表現基因，從抽穗前 20 天至抽穗前 10 天均呈現低表現量，近抽穗日表現量增高，*SSII-2*、*SBEI*、*SBEIII* 與 *SBEIV* 屬於這類型表現的基因 (圖五)。

1.4. α -amylase, β -amylase 及 *OsSUTs* 基因於葉鞘儲存-供源轉變期間之表現

水稻葉鞘由儲存組織轉變成供源組織時，可依其醣類代謝過程分成三階段：首先澱粉會在葉鞘中大量合成並累積，接著抽穗後澱粉快速分解且合成蔗糖，最後蔗糖會轉運到發育的穀粒中幫助穀粒充實。所以我們除了分析澱粉合成相關基因於抽穗期間的表現情形外，還探討了澱粉分解相關基因（包含 α -amylases 與 β -amylase）及蔗糖轉運蛋白基因 (*OsSUTs*) 之表現變化。在 α -amylase 基因家族中，以 real-time RT-PCR 技術分析了 α -amylase1A、2A 及 3E 三個成員在-2 葉葉鞘中於抽穗期間的表現，結果顯示 α -amylase1A 及 3E 之 mRNA 含量在儲存型葉鞘與供源型葉鞘中沒有明顯差異（圖六 a、c），而 α -amylase2A 在抽穗後 14 天的表現量為抽穗前 14 天的 1.7 倍。另外，葉鞘中 β -amylase 基因之表現在抽穗後 14 天為抽穗前 14 天的 1.6 倍（圖六 b、d）。

在分析水稻葉鞘五個蔗糖轉運蛋白基因 (*OsSUT1~5*) 在抽穗期間的表現變化中，結果顯示 *OsSUT3* 及 5 其基因表現量極低而幾乎偵測不到，而 *OsSUT1* 及 4 之 mRNA 含量在供源型葉鞘中有被提高之趨勢（圖七 a、c）。*OsSUT1* 在儲存時期的葉鞘中沒有明顯變化，直到抽穗後大量提高表現，並於抽穗後 7 天達到最大 mRNA 含量，而抽穗後 14 天的表現量為抽穗前 14 天之 2.1 倍（圖七 a）。*OsSUT4* 基因表現於抽穗前亦無明顯改變，抽穗之後緩慢上升，而於抽穗後 14 天到達高峰，抽穗後 14 天之 mRNA 含量為抽穗前 14 天的 1.6 倍（圖七 c）。然而 *OsSUT2* 則不論在抽穗前或抽穗後均沒有明顯變化，但其 mRNA 於葉鞘中的含量高於 *OsSUT1* 及 4 兩基因（圖七 b）。

2. 以 Microarray 分析儲存期及供源期葉鞘中之基因表現

為了瞭解葉鞘於儲存-供源轉變期間，除了澱粉合成、澱粉分解與蔗糖轉運等代謝過程外，還包含哪些生理代謝反應參與其中，故利用 Microarray 技術廣泛分析水稻-2 葉葉鞘在儲存時期及供源時期之基因表現。首先，收取抽穗前 25 天到抽

穗後 15 天期間之水稻-2 葉葉鞘，並以五天為一個間隔，測定澱粉含量變化，根據澱粉含量變化，選擇抽穗前 10 天及抽穗後 5 天之葉鞘，分別做為分析儲存期及供源期葉鞘中基因表現差異之材料。

於 Microarray 分析結果顯示，總共有 223 個基因在抽穗前後期有明顯的差異性表現，在供源時期的葉鞘有 115 個基因之表現量被提高 (up-regulated)，而有 108 個基因被降低了表現 (down-regulated)，將這些基因依照其功能分群，其中挑選了醣類代謝/醣基修飾 (carbohydrate metabolism / glycosylated modification)、分子轉運 (molecule transport)、荷爾蒙合成 (hormone synthesis)、生長發育調控 (developmental regulation) 以及訊息傳導/轉錄調控 (signaling / transcriptional regulation) 等五群進行進一步分析 (圖八)。為了證實 microarray 結果之正確性，收集抽穗前 14 天至抽穗後 14 天之水稻-2 葉葉鞘，每七天為一個間隔，另設計專一性引子 (表三) 並使用 real-time RT-PCR 技術偵測圖八中 30 個基因 (表四) 於抽穗前 14、7 天及抽穗後 0、7 及 14 天之表現變化，且將五個時間點分別定義為五個葉鞘生長發育階段 (stage1~5)。將 real-time RT-PCR 分析結果中 stage4 與 stage2 之基因表現量相除，所得數值代表此基因於供源期葉鞘中與儲存期葉鞘中表現之比值，進一步跟 Microarray 分析結果中供源期與儲存期表現比值進行相關性分析，所得相關系數為 0.6788 ($p < 0.01$)。

上述以 real-time RT-PCR 分析結果，在此另將 2 個醣類代謝及 3 個分子轉運蛋白基因之數據呈現於圖九。其中 *sucrose synthase* (AK100334) 之基因表現變化趨勢與葉鞘中澱粉含量變化一致，均於抽穗當天達到最大量 (圖九 a)，而另一個醣類代謝基因 *β -D-glucan exohydrolase* (AK065044) 則為抽穗前表現高於抽穗後之表現，並在抽穗前 7 天時 mRNA 含量達到最高峰 (圖九 a)。此外，葉鞘中有三個分子轉運蛋白基因：*putative sorbitol transporter* (AK073216)、*ammonium transporter* (AK107601) 及 *phosphate transporter* (AK063990) 在抽穗後會大量表現，尤其 *ammonium transporter* 基因於抽穗後 14 天之表現為抽穗前 14 天的 15 倍 (圖九 b)。

3. 探討荷爾蒙是否為調控葉鞘儲存-供源轉換之內在因子

3.1. 澱粉合成基因啟動子分析

由葉鞘中澱粉合成相關基因於抽穗期間之表現變化分析結果得知，有六個基因 (*AGP-L2*、*GBSSII*、*SSSI*、*SBEI*、*SBEIII* 及 *SBEIV*) 與葉鞘澱粉含量變化相關性相當高，推測其為主要影響抽穗前澱粉大量累積之主要基因，欲找尋水稻葉鞘由儲存組織轉變成供源組織時期，調控此六個澱粉合成基因表現之上游因子，由 NCBI 網站搜尋 Nipponbare 水稻品種基因組 DNA，擷取六個關鍵基因轉譯起始碼 (ATG) 上游 1.5-kb 序列 (5' -flanking sequence)。利用 Plant *Cis*-Acting Regulatory DNA Elements (PLACE) 網站搜尋位於這些基因上游序列之 *cis*-acting elements，經過比對發現有五個與荷爾蒙訊息傳導相關之調控序列位在所有基因之上游序列中，如表五所示，這些調控序列分別為：(一) ARR1AT element，其與細胞分裂素 (cytokinin) 的反應有關 (Ross et al., 2004)；(二) DOFCOREZM element，為 DOF 轉錄因子之結合區，目前已知水稻之 DOF3 會與 GAMYB 轉錄因子鍵結，幫助 GAMYB 與 GARE element 之結合，促進 GA-response 的下游基因表現 (Washio, 2003)；(三) MYBCORE element，是與 GA 及 ABA 反應有關的調控區域 (Abe et al., 1997; Washio, 2003)；(四) MYCCONSENSUSAT element，已知其參與在 ABA 的訊息調控路徑上 (Abe et al., 2003)；(五) WRKY71OS element，為 WRKY71 轉錄因子之結合區，被認為是參與在 ABA/GA 之訊息反應中 (Zhang et al., 2004; Xie et al., 2005)。另外，還發現有三個與光訊息傳導相關的 *cis*-acting elements，也同樣位於六個澱粉合成基因上游序列中 (表五)：(一) GT1CONSENSUS element，被發現位在許多與光反應有關之基因啟動子區域 (Villain et al., 1996)；(二) INRNTPSADB element，為一些光反應基因啟動所需之調控區，在功能上可以取代 TATA box (Nakamura et al., 2002)；(三) GATABOX element，目前已知與光調控有關 (Lam and Chua, 1989)。

3.2. 荷爾蒙相關轉錄因子-*OsDOF3* 與 *OsWRKY71* 在葉鞘中於抽穗期間之表現分析

由比對 *AGP-L2*、*GBSSII*、*SSSI*、*SBEI*、*SBEIII* 及 *SBEIV* 六個澱粉合成基因上游序列結果得知，他們共同具有五個與荷爾蒙反應相關之 *cis-acting elements*，搜尋 database 上水稻中已知的結合 *trans-acting elements*，得到兩個轉錄因子 (*OsDOF3* 與 *OsWRKY71*)，為探討這兩個轉錄因子是否可能參與在葉鞘儲存-供源轉換的調控過程中，收集抽穗前 14 天與抽穗後 0、14 天之水稻-2 葉葉鞘，設計專一性引子 (表一) 並以 real-time RT-PCR 技術分析其基因表現變化。如圖十結果所示，*OsDOF3* 於儲存期葉鞘中的基因表現高於供源期葉鞘中的表現，抽穗前 14 天的表現量為抽穗後 14 天的 2.4 倍。而 *OsWRKY71* 之 mRNA 含量則是在抽穗之後增多，抽穗後 14 天之表現量為抽穗前的 3.4 倍 (圖十)。兩個轉錄因子在抽穗期前後均表現出明顯的差異性，推測其可能亦參與葉鞘儲存-供源轉變之調控途徑中。

3.3. 植物荷爾蒙對切離葉鞘中澱粉含量的影響

為了瞭解植物荷爾蒙是否為調控水稻葉鞘中澱粉含量變化的因子，將抽穗前及抽穗後 7-10 天之-2 葉葉片由水稻植株上切離下來，分別浸泡在含有 100 μM 之 GA、ABA 及 BAP 水溶液中，經過 24 小時處理後，觀察葉鞘的生長狀況並測定其中澱粉含量。測量儲存期對照組 (僅處理水) 葉身與葉鞘的生長情形，發現這個時期-2 葉葉鞘和葉身還會有延長的趨勢，其中葉身伸長 0.2~0.25 公分，而葉鞘大約只伸長 0.05 公分。另外，在 GA 的處理中，葉鞘和葉身都比對照組明顯有更加伸長的趨勢，葉身大約伸長 0.4~0.45 公分，而葉鞘則伸長 0.1~0.2 公分，此結果證實 GA 處理為有效處理 (圖十一 a)。而儲存期葉鞘在 ABA 的處理中完全停止生長，且葉身的生長也比對照組慢，僅生長 0.05~0.1 公分 (圖十一 a)，進一步使用 real-time RT-PCR 分析 *OsRab16A* (ABA 誘導表現基因) 基因於 ABA 處理葉鞘中的表現，發現其表現量大約為對照組葉鞘的 60 倍 (data not shown)，證實 ABA 於葉鞘中亦為有效處理。而 BAP 則對儲存期葉鞘與葉身之生長沒有影響 (圖十一 a)。另外，抽

穗後 7-10 天的葉鞘在三種荷爾蒙處理中均不再延長，表示此時的-2 葉葉片已經完全停止生長 (data not shown)。

儲存期葉鞘在 GA 及 ABA 的處理下都會使澱粉含量下降，分別為對照組的 0.64 與 0.65 倍，而 BAP 對儲存期葉鞘中的澱粉含量成現正調控，並與對照組相比為對照組的 1.25 倍 (圖十一 b)。供源型葉鞘處理三種荷爾蒙的結果和儲存型葉鞘相似，ABA 使葉鞘澱粉減少為對照組的 0.29 倍，而 BAP 使葉鞘中的澱粉含量比對照組高出 2 倍，另一方面，GA 會輕微提升供源型葉鞘澱粉含量 (圖十一 c)。綜合結果來看，ABA 會降低水稻葉鞘中暫存性澱粉之含量，BAP 則會使其含量輕微增高，而 GA 對葉鞘澱粉含量影響並不穩定。

3.4. 植物荷爾蒙 ABA 對切離葉鞘中澱粉代謝相關酵素活性及 *OsSUTs* 基因表現的影響

由切離葉鞘處理荷爾蒙之試驗，得知 ABA 會降低葉鞘中澱粉含量變化，欲進一步證實 ABA 是否藉由調控澱粉代謝相關酵素之活性，進而影響葉鞘澱粉含量，收取抽穗前 7-10 天水稻-2 葉切離葉鞘，處理 100 μ M ABA 24 小時，而後測定澱粉合成相關酵素 (AGPase、GBSS、SSS 及 SBE) 與澱粉分解酵素 (α -amylase 及 β -amylase) 之活性。如圖十二所示，結果顯示 ABA 不會顯著影響 SBE 及 SSS 之酵素活性 (圖十二 b、d)，而會使 AGPase 與 GBSS 的酵素活性降低，其 *p-value* 分別為 0.0176 與 0.0007。在澱粉分解相關酵素的影響上，發現 ABA 會促進 α -amylase 及 β -amylase 酵素活性高達兩倍以上 (*p-value* 分別為 0.0007 與 0.0131)，綜合結果來看，ABA 會抑制 AGPase 及 GBSS 的酵素活性 (圖十二 a、c)，而大量提升 α -amylase 與 β -amylase 的酵素活性 (圖十二 e、f)。

除了前述澱粉合成與澱粉分解相關酵素會受到 ABA 顯著影響，我們也觀察水稻蔗糖轉運蛋白在 ABA 處理中的基因表現變化。收取抽穗前 7-10 天經 100 μ M ABA 處理 24 小時之水稻-2 葉葉鞘，以 *OsSUTs* 基因專一性引子 (表一) 進行

real-time RT-PCR，分析 *OsSUT1*、2、3、4 及 5 基因表現變化。結果如圖十三所示，除了 *OsSUT3* 及 5 因表現量太低而偵測不到之外，*OsSUT1*、2 及 4 均受 ABA 正向調控（其 *p-value* 分別為 0.0256、0.0010 與 0.0025），於 ABA 處理下，分別使 *OsSUT1*、2 及 4 之基因表現量提升為對照組的 2.4、2.2 與 2.1 倍。

3.5. 抽穗期間水稻葉鞘中內生 ABA 含量與澱粉分解酵素活性變化

欲了解 ABA 是否在葉鞘中參與澱粉代謝之調控，或扮演著調控儲存-供源轉換的角色，我們採收抽穗前 3 天到抽穗後 25 天成株水稻-2 葉葉鞘，每 7 天為一個間隔，偵測葉鞘內澱粉含量、內生 ABA 含量變化及澱粉分解相關酵素之活性變化，並分析其彼此間的相關性。由實驗結果得知，澱粉累積量最高峰在抽穗前 3 天，抽穗後澱粉快速降解（圖十四 a），而 ABA 含量從抽穗前 3 天至抽穗後 11 天的變化不大，於抽穗後 11 天開始上升，到了抽穗後 18 天出現最大量，之後又繼續下降（圖十四 b）。另外，在採收的時期中，葉鞘中 α -amylase 的活性僅於抽穗後 11 天些微上升，於其他時間點並無明顯變化（圖十四 c）。相較於 α -amylase 活性的改變， β -amylase 之活性變化較為顯著，其於抽穗前 3 天即開始上升，從抽穗後 4 天到 25 天都維持在高活性的區域（圖十四 d）。

4. 探討水稻葉鞘於儲存-供源轉換時，調控 *OsSUT* 基因表現之訊息因子

4.1. 台農 67 水稻之 *OsSUT1*、2、4 基因之啟動子分子分析

由分析葉鞘水稻蔗糖轉運蛋白於抽穗期間之表現中，發現 *OsSUT1* 與 4 在供源型的葉鞘中會增加 mRNA 之轉錄量，故藉由分析 *OsSUT* 基因不同長度啟動子之活性，以篩選其他參與水稻葉鞘儲存-供源轉換之調控因子。首先，由 TNG67 水稻鈎取 *OsSUT1*、2、4 基因之啟動子：（一）*OsSUT1* 基因啟動子（簡稱 PSUT1），以轉譯起始碼（ATG）之 A 為 +1，擴增範圍為 -10~-1968，總長為 1959 bp。與 Nippobare 水稻品種之序列（Ac. No. AP008209，比對範圍由 3,785,731 至 3,787,693）進行比

對，其同源性為 99%。進一步以 PLACE 資料庫進行比對，分析啟動子上方與植物荷爾蒙及醣類調控相關的 *cis*-acting elements，發現 PSUT1 上與荷爾蒙有關之調控序列有 ARR1AT、ABRERATCAL、ABRELATERD1、ABREZMRAB28、ABREATCONSENSUS、ACGTABREMOTIFA2OSEM、ASF1MOTIFCAMV、BRELATERD1、CATATGGMSAUR、DPBFCOREDCDC3、DRE2COREZMRAB17、EMBP1TAEM、GAREAT、GT1CONSENSUS、LTRECOREATCOR15、MYB1AT、MYBGAHV、MYB2CONSENSUSAT、MYCONSENSUSAT、RYREPEATVFLEB4、WBOXATNPR1、WRKY71OS 等 22 種，與醣類反應相關的有 ACGTABOX、WBOXHVIS01、SREATMSD 等 3 種，而 TATCCAOSAMY 則被認為同時參予在醣類和荷爾蒙的調控路徑 (圖十五)。(二) *OsSUT2* 基因啟動子 (PSUT2)，擴增範圍為 -1~830，總長為 830 bp，與 Nippobare 水稻品種 (Ac. No. AP008218, 比對範圍由 27,554,168 至 27,554,997) 之同源性為 100%。PSUT2 上與荷爾蒙調控相關的 *cis*-acting elements 有 ABRELATERD1、ARR1AT、DPBFCOREDCDC3、ERELEE4、GT1CONSENSUS、MYB1AT、MYCATFD22、MYCONSENSUSAT、WBOXATNPR1、WRKY71OS 等 10 種，而參與醣類調控之序列僅有 WBOXHVIS01 (圖十六)。(三) *OsSUT4* 基因啟動子 (PSUT4)，擴增範圍為 -11~843，總長為 833 bp，與 Nippobare 水稻品種序列 (Ac. No. AP008208, 比對範圍由 35,566,742 至 35,567,574) 進行比對，所得同源性為 100%。PSUT4 具有 ABRERATCAL、ARR1AT、ASF1MOTIFCAMV、DPBFCOREDCDC3、GAREAT、GT1CONSENSUS、LTRECOREATCOR15、MYBGAHV、MYCATFD22、MYCONSENSUSAT、WBOXATNPR1、WRKY71OS 等 12 種與荷爾蒙有關之調控序列，而在醣類相關的 *cis*-acting element 中，有 PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A 與 WBOXHVIS01 兩種調控部位 (圖十七)。

4.2. *OsSUT1*、2 及 4 基因啟動子於葉鞘中的暫時性表現分析

Scofield 等人 (2007) 曾經利用 *OsSUT1* 啟動子接上 β -glucuronidase (*GUS*) 報導基因 (PSUT1::*GUS*) 以及免疫定位法 (immunolocalization) 觀察蛋白質表現位置，發現不論 PSUT1::*GUS* 活性及 *OsSUT1* 蛋白質均會在韌皮部組織中表現，故先使用基因槍法，分析水稻韌皮部專一表現基因 (*Thioredoxin h*; *TRXh*) 之啟動子 (Ishiwatari et al., 2000) 與 *GUS* 報導基因於葉鞘中的活性 (PTRXh::*GUS*)，以確定水稻葉鞘組織適合進行基因槍法暫時性表現分析。利用 PTRXh 專一性引子 (表六)，並以 genomic-PCR 合成 *TRXh* 基因啟動子片段 (-1025/-16)，接在 *GUS* 報導基因之前 (PTRXh::*GUS*)，於成株水稻葉鞘中進行暫時性表現。如圖十八 a 所示，PTRXh::*GUS* 之 *GUS*/*LUC* 比值比對照組高出 23 倍左右，結果證明可於水稻成株葉鞘中進行基因槍法暫時性表現分析，即使位於葉鞘中間的韌皮部組織，亦可由基因槍順利擊入並表現出 *GUS* 活性。進行 *OsSUT* 基因啟動子分析時，需同時比較儲存型葉鞘與供源型葉鞘的活性，為測試不同時期葉鞘本身對表現 *GUS* 活性是否具有差異性，將接有 *Ubiquitin* 啟動子與 *GUS* 報導基因 (PUBi::*GUS*) 的質體同時表現於儲存型與供源型葉鞘，並比較其活性差異，結果如圖十八 b 所示，兩種葉鞘之 *GUS*/*LUC* 活性沒有明顯差異，儲存型葉鞘之 *GUS* 活性為供源型葉鞘的 1.2 倍，顯示不同時期葉鞘本身並不會造成 *GUS* 活性表現有差異，這些測試可支持後續進行 *OsSUT* 基因啟動子分析。

雖然含有 intron 之質粒可能增強報導基因之表現，但亦有可能影響啟動子本身之特性，因此將 PSUT1 (-1968/-10)、2 (-830/-1) 及 4 (-843/-11) 啟動子分別接上含有 ubi-intron 之 *GUS* 報導基因 (PSUT::ubint::*GUS*) 與不含 ubi-intron 之 *GUS* 報導基因 (PSUT::*GUS*)，同時進行基因槍暫時性表現並比較其結果。發現 PSUT1::*GUS*、PSUT2::*GUS* 及 PSUT4::*GUS* 三種啟動子所呈現的 *GUS* 活性均非常低，但因表現趨勢與接有 intron 的結果相似，故以含有 ubi-intron 的 *GUS* 報導基因做為暫時性表現分析之載體 (data not shown)。

欲知道 *OsSUT* 基因啟動子於兩時期葉鞘中的活性，是否與其 mRNA 表現趨勢相符合，利用基因槍暫時性表現系統，分析儲存期（抽穗當天）與供源期（抽穗後 30 天）-2 葉葉鞘中，三種 PSUT 啟動子之表現活性。結果顯示在 PSUT1 (-1968/-10) 啟動子中，供源型葉鞘的 GUS 活性為儲存型葉鞘的 2.5 倍（圖二十一 a）。而 PSUT4 (-843/-11) 亦在供源型葉鞘中表現出較高之 GUS 活性，與儲存型葉鞘的倍數差異為 3.9 倍（圖二十一 a）。另外，PSUT2 (-830/-1) 在供源型葉鞘與儲存型葉鞘中的表現沒有明顯差異（圖二十一 a）。另一方面，將 PSUT1、2 及 4 啟動子於葉鞘中的活性趨勢與其 mRNA 於抽穗期間的表現量相比，顯示三者之 GUS 活性與內生 *OsSUT* mRNA 表現量變化的趨勢均相符合（圖二十一 b）。

4.3. *OsSUT4* 基因不同長度啟動子片段之暫時性表現分析

在 PSUT1 (-1968/-10)、2 (-830/-1) 及 4 (-843/-11) 啟動子之暫時性表現分析中，PSUT4 之 GUS 活性在抽穗前後呈現最大的倍數差異，欲找出影響表現差異之調控因子，藉由 PSUT4 之 5'端 deletion 啟動子片段進行葉鞘暫時性表現分析。首先，採收儲存期葉鞘（抽穗前 5 天）及供源期葉鞘（抽穗後 15 天），分別將 PSUT4-DF (-843/-11)、PSUT4-DF(-643/-11)、PSUT4-DF(-434/-11) 及 PSUT4-DF(-248/-11) 不同長度 5'端 deletion 片段進行暫時性表現分析。如圖二十三 a 所示，結果顯示 PSUT4-DF(-843/-11) 於供源期葉鞘的 GUS/LUC 表現量為儲存期葉鞘的 3.7 倍，而 PSUT4-DF(-643/-11) 於供源期葉鞘的活性表現是儲存期葉鞘的 3.3 倍。此外，雖然 DF(-843/-11) 與 DF(-643/-11) 都在抽穗前後呈現相似倍數之差異性表現，但長度較長的 DF(-843/-11) 其 GUS 活性卻低於 DF(-643/-11)。另外，PSUT4-DF(-434/-11) 與 PSUT4-DF(-248/-11) 在抽穗前後之表現沒有顯著差別。故為了進一步釐清造成葉鞘兩時期差異性表現的調控區域，將 PSUT4-DF(-643/-11)、PSUT4-DF(-602/-11)、PSUT4-DF(-550/-11)、PSUT4-DF(-483/-11)、PSUT4-DF(-434/-11) 及 PSUT4-DF(-248/-11) 等不同長度片

段進行暫時性表現分析。結果顯示 PSUT4-DF(-643/-11)、PSUT4-DF(-602/-11)與 PSUT4-DF(-550/-11)在抽穗前後均呈現差異性表現，分別有 5.7、4.1 與 4.4 的倍數差異 (*p-value* 分別為 0.01113、0.00778 及 0.00798) (圖二十三 b)。而 PSUT4-DF(-483/-11)、PSUT4-DF(-434/-11)與 PSUT4-DF(-248/-11) 之表現結果相似，在儲存型葉鞘跟供源型葉鞘的活性均沒有差別 (圖二十三 b)。綜合 PSUT4 不同長度片段之暫時性表現結果得知，抽穗前後倍數變化最大的兩個落差在 -484~-550 與 -603~-643 之間，暗示影響 *OsSUT4* 基因於抽穗後會大量表現的調控序列可能位在這兩個區域中。

分析兩段序列之特殊 *cis-acting elements*，結果如圖二十四所示，DF(-643/-603) 上有兩個僅出現在此區域之調控序列，分別為 (一) ACGTTBOX element (-640)，為 bZIP 轉錄因子之結合區；(二) INTRONLOWER element (-623)，已知是介入子與表現子的黏合區 (3' intron-exon splice junctions)。而 DF(-550/-484) 區域上亦有兩個只出現於此區域的調控序列，分別為 (一) CURECORECR element (-506)，已知其參與在銅離子反應與氧化反應中；(二) WBBOXPCWRKY1 element (-514)，為 WRKY1 轉錄因子結合區。

4.4. *OsSUT4* 基因之 DF(-550/-484)與 DF(-643/-603)啟動子片段進行 EMSA 分析

欲證實調控 *OsSUT4* 在抽穗後大量表現的 *cis-acting elements* 可能位在 DF(-550/-484)與 DF(-643/-603)兩個啟動子區域，利用具有 Biotin 標定之 DNA 片段進行 EMSA 實驗 (圖二十四)，確定兩片段具有與核蛋白結合之能力。純化完之 DF(-550/-484)與 DF(-643/-603) 探針分別與儲存型葉鞘與供源型葉鞘的核蛋白進行 EMSA 反應，結果顯示 DF(-550/-484)與儲存型葉鞘核蛋白會形成 2 個 DNA-Transcription factor (DNA-TF) 複合物 (S2 與 S3)，而與供源型葉鞘核蛋白只會形成 1 個 DNA-TF 複合物(S3) (圖二十五 a)，而 DF(-643/-603)與兩個時期的葉鞘核蛋白均沒有形成 DNA-TF 複合物 (圖二十五 b)，圖中 S1 可能為細胞質蛋白殘留

所造成之背景值。

以 0X、0.5X 與 1X 濃度之未標定 DF(-550/-484) 探針比例進行競爭型實驗，結果顯示原本在抽穗前出現的 2 個 DNA-TF 複合物 (S2 與 S3) 在 1X 的 DNA 濃度競爭下會明顯減少，而抽穗後出現的 1 個 DNA-TF 的複合物 (S3) 在 0.5X 的 DNA 濃度競爭下會完全消失。顯示抽穗前的 2 個 DNA-TF 複合物 (S2 與 S3) 及抽穗後的 1 個 DNA-TF 複合物 (S3) 均為專一性結合 (圖二十六)。

4.5. *OsSUT4* 基因不同長度啟動子之穩定性表現分析

關於利用基因槍進行水稻葉片暫時性表現之研究非常少，欲進一步證實此系統可於葉鞘中進行，我們轉殖 *OsSUT4* 不同長度啟動子片段於水稻中，以轉植株葉鞘 GUS 活性來輔助基因槍暫時性表現系統之正確性。我們共進行 7 種質粒 DNA 之水稻基因轉殖：pCamPSUT4-DF(-843/-11)、pCamPSUT4-DF(-643/-11)、pCamPSUT4-DF(-550/-11)、pCamPSUT4-DF(-434/-11)、pCamPSUT4-DF(-328/-11)、pCamPSUT4-DF(-248/-11) 及 pCamPSUT4-DF(-139/-11)，其感染癒合組織數目分別為 145、123、71、81、96、60 與 92 顆，經過 50 mg/L 之 hygromycin 篩選後，獲得健康幼苗與白化苗，健康苗以 genomic-PCR 確定為轉植株後，計算其轉殖效率介於 3.1~14.8% (表八)。

轉植株再利用 GUS 染色分析法觀察 PSUT4 不同長度啟動子於轉殖水稻中的組織專一性，總共分析了 pCamPSUT4-DF(-843/-11)、pCamPSUT4-DF(-643/-11) 與 pCamPSUT4-DF(-434/-11) 三種長度啟動子，每個長度啟動子分析兩個獨立轉殖系 (independent lines)，如圖二十八所示，pCamPSUT4-DF(-843/-11) 的 GUS 活性不論在營養器官(葉片與葉鞘)或生殖器官(包含花、小穗軸) 的表現都非常弱，僅有在開花後的雄蕊上偵測到微弱的 GUS 活性 (圖二十八 p)。而 pCamPSUT4-DF(-643/-11) 與 pCamPSUT4-DF(-434/-11) 兩種長度的啟動子片段在葉片、葉鞘與穗上均可以偵測到 GUS 活性，故 pCamPSUT4-DF(-434/-11) 的啟動子長度並不影響其 GUS 組織

表現 (圖二十八)。另外，觀察 PSUT4-DF(-434/-11)-49 轉殖系花器的染色結果時，發現孕穗期的花藥上並沒有 GUS 活性，而在開花後的花藥卻可以表現很強的 GUS 活性，推測 PSUT4 在花藥的表現具有生長發育上的調控 (圖二十九 b、c)。進一步觀察已抽出葉鞘但尚未開花的穎花，發現雌蕊會較花藥早出現 GUS 反應 (圖二十九 e)，而漸漸花藥中的花粉出現 GUS 活性，花藥壁亦呈現微弱 GUS 表現 (圖二十九 f、g)。而正開完花的花藥壁則呈現很強的 GUS 活性，此時期內的花粉粒幾乎均已釋出 (圖二十九 h、i)。

在 T0 轉殖水稻中，以開花較早的主稈之-2 葉葉鞘當做供源型葉鞘材料，而開花較晚的分蘗-2 葉葉鞘當做儲存型葉鞘材料，分別收集後進行 GUS 酵素活性分析。總共分析了 4 株 pCamPSUT4-DF(-843/-11) 獨立轉殖系、4 株 pCamPSUT4-DF(-643/-11) 獨立轉殖系與 8 株 pCamPSUT4-DF(-434/-11) 獨立轉殖系，結果如圖三十所示，發現 pCamPSUT4-DF(-843/-11) 與 pCamPSUT4-DF(-643/-11) 兩種長度啟動子之轉植株，其於供源型葉鞘中的平均活性高於儲存型的葉鞘，各取三個獨立轉殖系將供源型葉鞘中的活性與儲存型葉鞘的活性相比，pCamPSUT4-DF(-843/-11) 為 4 倍，而 pCamPSUT4-DF(-643/-11) 的倍數為 2.4 倍。在 pCamPSUT4-DF(-434/-11) 轉植株的活性分析上，大多數植株在兩個時期的葉鞘沒有明顯差異 (圖三十)，三個獨立轉殖系的平均值為 1.1 倍。另外還發現，長度最長的 pCamPSUT4-DF(-843/-11) 片段所表現的 GUS 活性雖然在抽穗前後有差異性表現，但是相較於其他長度啟動子，其表現強度最低 (圖三十)。

討 論

1. 水稻 TNG67 之-2 葉葉鞘為抽穗期間主要澱粉儲存組織

水稻上位葉葉鞘之暫時性儲存能力及供源強度是決定高產的重要因子之一 (Cock and Yoshida, 1972; Samonte et al., 2001)，在此論文中，我們觀察到 TNG67 水稻之-1、-2 及-3 葉葉鞘均會於抽穗前累積澱粉，且於抽穗後開始降解，而-2 葉葉鞘儲存-供源轉變的現象比其他上位葉葉鞘更為明顯 (圖二 a)，這個結果與 Hirose 等人 (1999) 於 Nipponbare 水稻品種中觀察到的情形相符合。另一方面，於採收材料期間，劍葉葉鞘仍然還在生長，亦無儲存-供源轉變之情形發生，這些結果顯示 TNG67 水稻-2 葉葉鞘為抽穗前之主要澱粉暫存組織。另外，我們還測量抽穗前 20 天至抽穗後 20 天所有上位葉葉鞘及葉身長度的變化，發現-2 葉葉鞘於抽穗前 20 天已完全成熟，葉身與葉鞘幾乎已不再延長，顯示成熟之-2 葉葉鞘是當作一個儲存型的儲藏組織 (Storage sink)，然而-1 葉葉鞘於採收期間仍然在生長，表示-1 葉葉鞘之角色較偏向為生長型的儲藏組織 (growing sink)。

而葉鞘中的暫存性澱粉具有位置上的分佈特性，越靠近基部的位置其澱粉含量越多 (Ishimaru et al., 2004)，本實驗室也利用碘液染色的方法觀察到相同現象。而 Ishimaru 等人 (2004) 曾經測定-2 葉葉鞘不同部位於抽穗後 5 天的 α -amylase 酵素活性，發現靠近葉鞘基部其酵素活性最強，這些結果暗示調控澱粉代謝的主要基因不但具有時間上的表現差異 (抽穗前後期)，應該也具有位置上的表現差異，若將來欲研究未知功能基因是否參與葉鞘儲存-供源轉換之調控過程，可分析其在葉鞘中是否同時具有時間與空間上的分佈差異。

2. 稻穗的抽出及其碳源需求調控抽穗後時期葉鞘的供源能力

在分析水稻上位葉 (-1、-2 與-3 葉) 葉鞘中澱粉於抽穗期間的含量變化時，發現儲存在不同上位葉葉鞘之澱粉幾乎同時於抽穗當天開始降解，暗示上位葉葉鞘

中的澱粉代謝機制和稻穗的抽出似乎存在著某種關聯。為了證實這個假說，我們在抽穗前 5 天將水稻稻穗從劍葉葉鞘中移除，觀察-2 葉葉鞘中澱粉含量變化，與對照組相比，去除稻穗之植株其-2 葉葉鞘中的澱粉降解時間被延遲 (圖四)，暗示稻穗的抽出與其儲存需求 (sink demand) 可能扮演著調控葉鞘供源能力的角色。另一方面，去除幼穗的植株其葉鞘中的澱粉在抽穗後仍然繼續累積，暗示抽穗後葉鞘中的澱粉降解與醣類轉運的發生，並非是由於葉鞘老化而導致的供源現象。

3. 水稻葉鞘儲存-供源轉變之標識基因

Watanabe 等人 (1997) 研究水稻葉鞘於抽穗期間澱粉代謝相關酵素的活性變化，結果顯示 SBE、GBSS 與 SSS 均為葉鞘中調控澱粉合成的主要酵素，尤其以 SBE 活性變化與澱粉含量變化之相關性最高 (Watanabe et al., 1997)。為了進一步探討水稻葉鞘由儲存組織轉變成供源組織之分子調控機制，此論文中顯示 3 個 SBE 之 isogenes (*SBEI*、*III* 及 *IV*) 均與澱粉含量變化呈現高度正相關，另外，*AGP-L2*、*GBSSII* 與 *SSSI* 之表現，也與抽穗期間的澱粉量成正相關 (表二)，推測這些基因為影響抽穗前葉鞘澱粉大量累積之主要基因。

另一方面，這些與澱粉代謝相關基因可依其在抽穗期間的變化趨勢分成三群：第一群基因於抽穗前 20 天即達到最高表現量；第二群基因有於抽穗前 20 天僅具中度表現量，之後開始上升，直到抽穗前 10 天達到高峰；第三群基因在抽穗前 20 天至 10 天都呈現低表現，但於抽穗當日會大量表現 (圖五)。不僅是葉鞘，在充實階段之水稻穀粒，澱粉合成相關基因也具有分群表現的關係存在 (Ohdan et al., 2005; Dian, 2005)，暗示這群基因可能由不同的因子在調控，造成於時間分佈上呈現先後表現的順序。

在本篇論文中，我們也利用 microarray 技術去探討葉鞘中整個水稻 genome 在抽穗期間之表現，期望能對於葉鞘儲存-供源轉換之生理意義及分子調控機制更為明瞭。結果顯示，有許多基因於儲存期葉鞘與供源其葉鞘中呈現不同表現 (圖八、

表四)，其中包含了醣類代謝 (carbohydrate metabolism)、分子運輸 (molecule transport)、訊息傳導/轉錄調控 (signal transduction/transcriptional regulation)、荷爾蒙合成 (hormone biosynthesis) 與生長發育調控 (developmental regulation) 等相關基因。在醣類代謝相關基因中，*sucrose synthase* 和澱粉含量的變化呈現正相關 (圖九 a)，根據最近的研究，*sucrose synthase* 可以控制 ADP-glucose 及暫存性澱粉在葉片中的累積量，若在一轉殖植物中大量表現 *sucrose synthase* (*SUS*) 基因，葉片中 ADP-glucose 及暫存性澱粉之含量都會被大量提升 (Muñoz et al., 2005)，暗示 *SUS* 基因於儲存階段的葉鞘中表現量若被提高，可能同時促進了澱粉的合成。*SUS* 酵素分解蔗糖後所形成的 UDP-glucose，可再經由 UDPG pyrophosphorlase 及 ADPG pyrophosphorlase 作用生成 ADP-glucose (Denyer et al., 1996)，或是直接利用 ADP 為反應基質合成 ADP-glucose (Baroja-Fernandez et al., 2003)，而 Wang 等人 (1999) 利用免疫組織化學法 (immunohistochemical) 分析水稻三個 *SUS* 基因之表現位置，發現 Microarray 偵測到的 *SUS2* 會表現在葉部韌皮部與葉肉細胞中，暗示其功能可能為催化蔗糖以提供水稻葉鞘澱粉合成的前驅物，或是提供伴細胞進行呼吸作用、蔗糖卸載時所需之能量 (Hanggi and Fleming, 2001)。

另一個與醣類代謝相關的基因 - β -D-glucan exohydrolase 之 mRNA 在抽穗前含量遠高於抽穗後 (圖九 a)，這個酵素已知參與在種子發芽階段、鞘葉延長及果實成熟時植物細胞壁的鬆弛與降解之過程 (Varghese et al., 1999; Lazan et al., 2004)，而其在葉鞘中的生理意義及功能仍需要被研究與探討。

β -amylase 則是在抽穗後澱粉快速降解時具有高度表現，推測其極有可能扮演著水稻在抽穗之後，水解葉鞘澱粉之主要角色 (圖六 d)。另外，Perez (1971) 與 Ishimaru 等人 (2004) 發現莖稈和葉鞘中的 α -amylase 酵素活性在抽穗期間會增加，然而，前人研究指出 α -amylase3D 基因在葉鞘抽穗後並沒有明顯提高其表現量 (Takahashi et al., 2005)，故我們偵測了葉鞘中 α -amylase 1A、2A 與 3E 基因在抽穗期間之表現，結果發現 α -amylase 表現量均低於 β -amylase，且僅有 α -amylase 2A

於抽穗後有提高表現 (圖六 a-c)。一般來說，發芽中的水稻種子富含 α -amylase，且主要負責分解種子胚乳內儲藏的澱粉，而在阿拉伯芥的葉片，澱粉粒主要由 β -amylase 水解成 maltose，並且是葉綠體中澱粉降解之主要途徑 (Smith et al., 2005)，暗示不同組織間澱粉水解機制可能不盡相同。

除了澱粉降解，醣類裝載 (loading) 至韌皮部並轉運到其他儲藏組織是供源組織的另一個重要特性，阿拉伯芥的蔗糖轉運蛋白- AtSUC2 就被認為是葉片由儲存組織轉變成供源組織之主要標識基因 (Wright et al., 2003)。而於水稻葉鞘儲存-供源轉換時期，*OsSUT1* 之 mRNA 含量會隨著抽穗而增高 (Hirose et al., 1999, 圖七 a)，除了 *OsSUT1* 之外，我們也探討了水稻另外 4 個 *SUT* 基因於抽穗期間的表現，結果顯示 *OsSUT4* 基因也呈現在抽穗之後會提高表現量的趨勢 (圖七 c)，推測這兩個水稻蔗糖轉運蛋白可能在葉鞘中扮演著將蔗糖裝載到韌皮部中之重要角色，而 *OsSUT1* 已經被證實於葉片中具有裝載蔗糖之功能 (Ishimaru et al., 2001; Scofield et al., 2002)。

除了 *OsSUT* 基因外，由 microarray 與 real-time RT-PCR 分析也發現一個 putative *sorbitol transporter* 於抽穗前後具有差異性表現 (圖九 b)，在一些水果中，sorbitol 是重要的光合作用產物，也是韌皮部中主要醣類運輸形式 (Gao et al., 2003)，而 Loescher 等人 (1982) 發現當蘋果葉由儲存狀態轉變成供源狀態時，會伴隨 sorbitol dehydrogenase 活性降低與 sorbitol 的含量提升，也發現 sorbitol 的代謝情形在幼葉與成熟葉片有差異存在，並推測 sorbitol 的代謝參與在葉片儲存-供源轉變的調控中 (Loescher et al., 1982)。然而在水稻研究中，卻很少關於 sorbitol 的資訊可供我們參考鑑定 *sorbitol transporter* 在葉鞘中扮演的功能與角色。

在發育中的穀粒，氮素的累積與醣類的累積一樣重要，根據Mae與Ohira (1981) 的研究，利用 ^{15}N 標定之 ammonium sulfate 若被葉身及葉鞘吸收之後，會在生殖生長期的時候轉運到正在生長的器官中。我們發現水稻-2 葉葉鞘中的 *ammonium transporter* 於抽穗後 14 天會大量提升表現 (圖九 b)，除了葉鞘外 (Chen and Wang,

2008), *ammonium transporter*也會在其他組織表現, 例如葉部 (Suenaga et al., 2003) 與根部 (Wang et al., 1993; Kumar et al., 2003; Sonoda et al., 2003), 雖然需要更多實驗去瞭解 *ammonium transporter* 在葉鞘中所扮演之功能, 但是這些結果已初步暗示我們不只是醣類, 氮素的運移都可能和葉鞘儲存-供源的轉換有關。

植物利用 *phosphate transporter* 從土壤中吸收無機磷 (inorganic Pi) (Smith et al., 2003), 而 *phosphate transporter* 於抽穗之後的時期表現量增加 (圖九b), 暗示我們供源階段的葉鞘也有無機磷的流動, 這個結果和 Tanaka (1961) 的研究相應證, 他們發現水稻葉鞘中的 Pi 含量在抽穗期間會改變。

總結來說, 對抽穗時期-2 葉鞘由儲存組織轉換成供源組織來說, 稻穗的抽出一個重要的訊息因子。而 *AGP-L2*、*GBSSII*、*SSSI*、*SBEI*、*SBEIII*、*SBEIV*、*sucrose synthase* 與 *β -amylase* 為-2 葉鞘在儲存-供源轉換期間與澱粉代謝相關之主要標識基因。蔗糖轉運蛋白 *OsSUT1*、*OsSUT4* 與 putative *sorbitol transporter* 可能於供源時期的葉鞘中, 負責運輸醣類到需要的儲藏組織中。除了醣類轉運蛋白, *ammonium transporter* 與 *phosphate transporter* 也在葉鞘中扮演重要營養轉運的角色, 從供源的葉鞘將無機磷及氮素傳送出去, 這些基因都可以當作葉鞘由儲存組織轉變為供源組織的重要標識基因。

4. 影響葉鞘中澱粉代謝的內在因子

由本論文 real-time RT-PCR 分析結果顯示, *AGP-L2*、*GBSSII*、*SSSI*、*SBEI*、*SBEIII* 及 *SBEIV* 等六個澱粉合成相關基因, 為影響葉鞘於抽穗前合成澱粉累積之主要基因, 為了探討這些基因之間是否具有相同的調控因子, 由 database 上搜尋六個基因之啟動子序列, 尋找共同的 *cis-acting elements* (表五)。由比對的結果得知, 這些基因之啟動子共同具有一些與植物荷爾蒙及醣類相關的 *elements*, 暗示其可能為水稻葉鞘中控制澱粉代謝之重要調控者。

在許多不同的植物種類中, 已證實 ABA 會影響澱粉合成相關基因之表現

(Rook et al., 2001; Akihiro et al., 2005; Wang et al., 2006)。另外，於菸草細胞中，cytokinin 也會影響 amyloplast 的發育及促進 *AGPS* 與 *GBSS* 之基因表現 (Miyazawa et al., 1999)。Akihiro 等人 (2005) 也發現 ABA 會增加 *AGP-L3*、*AGP-S1* 與 *AGP-S2* 等基因之轉錄量。荷爾蒙對於儲存組織或供源組織的影響也在許多植物中被報導過，Zhang 等人 (2005) 利用 C^{14} 追蹤小麥充實期的醣類流向，發現若在穗上施予 ABA 會阻礙充實，削弱種子儲存能力，而若是噴灑 GA 則會增強儲存能力。但是在水稻充實過程卻有不同的發現，Yang 等人 (2003) 指出在水稻開花後 11-15 天穗部噴灑 ABA，會增加穀粒的充實速度，而在穀粒充實期，種子中 ABA 含量和儲存強度具有明顯相關性。

我們由葉鞘中六個澱粉合成關鍵基因的啟動子上，搜尋到與 GA、ABA 及 cytokinin 調控相關的 *cis*-acting elements，比對 *AGP-L2*、*GBSSII*、*SSSI*、*SBEI*、*SBEIII* 與 *SBEIV* 基因啟動子上共同擁有之 *cis*-acting elements，找到六個相對應之 *trans*-acting element 基因：OsDof protein 是一個認得 DOFCOREZM element 的轉錄因子，被發現在水稻種子糊粉層細胞中，參與調控 GA-responsive 基因之轉錄 (Washio, 2001)。然而 *OsDof3* 基因在水稻葉鞘中的表現非常弱，所以其在葉鞘中所扮演的功能與角色在未來仍需要被探討。MYB 與 MYC 被認為是參與 ABA 訊息傳導的轉錄調控因子 (Urao et al., 1993; Abe et al., 2003)，他們相對應的 *cis*-elements 也出現在六個關鍵基因啟動子上 (表五)。ARR1AT 是被定義為與 cytokinin 訊息傳導相關的 *cis*-element，也同樣出現在關鍵基因啟動子的區域中。WRKY71OS 是另外一個被關鍵基因啟動子共同擁有的 *cis*-element，可被 OsWRKY71 轉錄因子認得。在前人研究中，OsWRKY71 扮演著溝通 GA 及 ABA 訊息傳導的角色而去調控 *α -amylase* 基因在種子糊粉層細胞中的表現 (Zhang et al., 2004; Xie et al., 2005)。未來可藉由探討這些轉錄因子在澱粉代謝相關基因表現的調控機制，將有機會幫助了解抽穗期間葉鞘中澱粉代謝的分子調控機制。

利用這三種荷爾蒙處理水稻切離葉鞘，觀察其對葉鞘中澱粉含量的影響，ABA

會降低澱粉含量，而 BAP 則會提升澱粉的累積量，GA 的處理則不明顯 (圖十一)。進一步測量葉鞘處理 ABA 後，其澱粉代謝相關酵素之活性變化，結果顯示 ABA 會促進 α -amylase 與 β -amylase 酵素活性，而抑制 AGPase 及 GBSS 活性(圖十二)。雖然於切離葉鞘試驗裡，ABA 很有可能作為控制葉鞘由儲存組織轉變成供源組織的關鍵因子，但是必須以完整植株去印證此假說。我們從抽穗前 3 天到抽穗後 25 天追蹤葉鞘中澱粉含量變化、ABA 含量變化以及 α -amylase 與 β -amylase 的酵素活性 (圖十四)，若 ABA 在葉鞘中扮演調控葉鞘儲存-供源轉變的角色，那四者之間之消長必定存在關聯性。Yang 等人 (2004)曾偵測穀粒中 ABA 含量、澱粉含量與澱粉合成相關酵素於水稻穀粒充實期之變化，發現不論是澱粉含量或 GBSS、SSS 及 SBE 等酵素活性的變化趨勢均與 ABA 含量相符合，暗示 ABA 可能參與調控穀粒中澱粉之合成。而我們的結果顯示，雖然葉鞘中澱粉含量下降與澱粉分解酵素活性提升的時間相吻合，但是內生性 ABA 含量至抽穗後 18 天才明顯上升，推測 ABA 並非主要調控葉鞘儲存-供源轉換的樞紐，而是扮演影響葉鞘中澱粉代謝之調控因子的角色，ABA 可以促進澱粉分解酵素的活性，並抑制 AGPase 與 GBSS 酵素之活性，雖然 Zhang 等人 (2004) 的研究指出 ABA 無法促進水稻糊粉層中 OsWRKY71 轉錄因子的表現，但是我們卻發現 ABA 在葉鞘中可以增加 OsWRKY71 基因的轉錄量 (data not shown)，是否可能因此使 OsWRKY71 表現量增加而抑制了澱粉合成相關基因的表現，仍然需要實驗去證實。

一般來說，高濃度醣類會增強澱粉合成相關基因之表現 (Koch, 1996)，在阿拉伯芥葉片中，蔗糖和葡萄糖都可以促進 *AGPS*、*AGP-L2* 與 *AGP-L3* 的表現量 (Sokolov et al., 1998)。Dian 等人 (2003, 2005) 證實水稻葉片中的 *SSSI*、*SSSII-2*、*SSSIII-1* 與 *GBSSII* 等基因之表現，會受到蔗糖誘導而增加。在馬鈴薯的葉片中，蔗糖含量會提高 *GBSSI* mRNA 的累積量 (Wang et al., 2001)。Takashi 等人(2005)也發現蔗糖與葡萄糖均會提升 *AGP-L3*、*AGP-L4* 及 *AGP-S1* 基因表現，植物也可以利用滲透壓影響醣類代謝基因之表現，進一步改變醣類含量。根據這些前人研

究，我們偵測水稻葉鞘在抽穗期間的葡萄糖、蔗糖與澱粉的含量變化 (圖三)，結果顯示在抽穗前澱粉累積的階段，並沒有發現蔗糖提升的趨勢，而在抽穗之後澱粉開始降解時蔗糖含量才上升，暗示葉鞘中的蔗糖並非主要調控澱粉累積之關鍵因子。葡萄糖含量於抽穗前消長趨勢不明顯，而於抽穗後澱粉分解時開始上升，推測其亦非促進儲存時期澱粉累積的調控因素。兩種醣類含量均在抽穗後上升，暗示供源期之葉鞘除了澱粉分解產生葡萄糖的累積外同時蔗糖也開始合成，準備裝載韌皮部進行運移。

5. 影響葉鞘中蔗糖轉運蛋白表現的內在因子

關於荷爾蒙是否調控蔗糖轉運蛋白表現的研究非常少，目前已知在馬鈴薯中，GA₃與ethephon會促進*StSUT4*的表現 (Chincinska et al., 2008)，而*StSUT1*會受到auxin (2,4-D)與cytokinin誘導而提高表現量 (Harms et al., 1994)。而水稻及阿拉伯芥中荷爾蒙對蔗糖轉運蛋白的影響及調控機制仍然未知，在本篇論文中，我們探討ABA植物荷爾蒙對水稻葉鞘中轉運蛋白的影響，結果顯示ABA的處理會使*OsSUT1*、2及4的基因表現量都上升 (圖十三)。偵測葉鞘中ABA在抽穗期間的含量變化，發現在抽穗後11天會有明顯的提升 (圖十四)，而*OsSUT4*的基因表現量也在抽穗後7~14天有顯著上升 (圖七)。雖然ABA在葉鞘中並非關鍵調控儲存-供源轉換的樞紐，但是其在抽穗後澱粉降解以及蔗糖轉運蛋白的調控上卻可能扮演著促進的角色。

許多研究指出醣類濃度會影響蔗糖轉運蛋白之表現，Weber 等人 (1997)最早研究蠶豆 *VfSUT1* mRNA 在不同蔗糖濃度下的表現，發現高濃度蔗糖與葡萄糖 (150 mM) 均會抑制子葉中 *VfSUT1* 的表現量。Chiou 及 Bush (1998) 利用切離葉片之葉柄吸收不同濃度蔗糖溶液，證實 *BvSUT* mRNA 表現及其酵素活性隨著濃度提升而下降。但是在玉米、水稻及阿拉伯芥蔗糖轉運蛋白的研究卻有不一樣的發現：阿拉伯芥 *AtSUC1* 會受到蔗糖誘導而提高表現量 (Sivitz et al., 2008)，而 14 天大之玉米

切離葉處理 50 mM 的蔗糖溶液時，亦會促進 *ZmSUT1* mRNA 的表現。水稻分離胚培養在含有 100 mM 蔗糖及葡萄糖的培養基時，胚中 *OsSUT1* 的表現量會升高，且會隨著培養時間越長而表現量越高 (Matsukura et al., 2000)。柑橘中蔗糖轉運蛋白 *CitSUT1* 與 *CitSUT2* 不但表現部位不同，其對醣類的反應也不一致，*CitSUT1* 主要表現在供源組織及醣類輸出的器官，並且會受到外加蔗糖、葡萄糖與甘露糖的抑制，而 *CitSUT2* 主要表現在儲藏組織等需要醣類輸入的器官，而不受上述醣類的施加而有所影響 (Yao et al., 2003)。這些前人研究暗示，蔗糖轉運蛋白的調控似乎並非單子葉與雙子葉的差別，不同 isoform 之調控特性亦可能具備組織專一性。由我們的研究中發現，抽穗後的葉鞘其蔗糖與葡萄糖含量都會上升 (圖三)，而蔗糖含量變化與 *OsSUT1* 基因表現變化趨勢完全相同，都於抽穗後 6-7 天達到最高峰，接著下降，暗示葉鞘中蔗糖可能為誘發 *OsSUT1* 基因在抽穗後表現量上升的調控因子。葡萄糖含量變化趨勢則與 *OsSUT4* 基因表現相似，於抽穗後緩慢上升，推測葡萄糖濃度影響 *OsSUT4* 於葉鞘中的表現。*OsSUT1* 基因啟動子上具有 4 種與醣類反應相關之調控區域 (ACGTBOX、SREATMSD、TATCCAOSAMY 與 WBOXHVIS01)，而 *OsSUT4* 基因啟動子上有兩種 (WBOXHVIS01 與 PYRIMIDINEBOXSRAMY1A)。利用水稻分離胚探討醣類對 *OsSUT1* 與 *OsSUT4* 基因表現的調控機制，發現短時間處理下 (24 小時)，葡萄糖會促進 *OsSUT4* 之表現 (陳, 2007)，而 *OsSUT1* 對葡萄糖的處理於短時間及長時間上呈現不同反應，短時間處理葡萄糖抑制 *OsSUT1* 表現，卻於長時間 (120 小時) 處理時促進其表現。葉鞘與胚為兩種結構功能相異之組織，葉鞘中蔗糖轉運蛋白是否與胚中之調控方式相同，必須依賴更進一步的實驗佐證，但於初步試驗可以瞭解抽穗後葉鞘蔗糖與葡萄糖濃度提升，伴隨 *OsSUT1* 與 *OsSUT4* 基因表現量上升，推測醣類參與在供源型葉鞘中蔗糖轉運蛋白之表現。

6. 調控葉鞘中 *OsSUT4* 在抽穗後大量表現之啟動子區域

本論文先前之研究顯示 *OsSUT1* 及 *OsSUT4* 在水稻上位葉葉鞘之表現會在抽穗之後明顯增強，推測此二 *OsSUT* 為主要負責蔗糖進行 phloem loading，以促進蔗糖由葉鞘轉運至穀粒之主要蔗糖轉運蛋白 (Chen and Wang, 2008)。進而，我們藉由分析水稻 *OsSUT* 基因於生殖生長期在葉鞘中表現之分子調控，探討水稻葉鞘將蔗糖轉運至充實中之穀粒的調控機制。首先，擴增 TNG67 水稻 *OsSUT1*、2、4 基因的啟動子區域 (圖十五~十七)，並構築暫時性表現載體。分析報導基因在抽穗前後的差異表現，並比對三個蔗糖轉運蛋白 mRNA 層次上的表現 (圖二十一)，發現 *OsSUT1* 與 4 不論是 RNA 表現或啟動子活性都呈現抽穗後高於抽穗前的趨勢，而 *OsSUT2* 則在抽穗前後均沒有明顯差異。進一步利用暫時性表現系統分析 *OsSUT4* 不同長度啟動子之活性，結果顯示啟動子由 -643 縮短到 -603 及 -550 縮短到 -484 時，其在供源型葉鞘增強表現之情形便消失 (圖二十三 b)。以 electrophoresis mobility shift assay (EMSA) 技術證實 DF(-550/-484) 片段分別與抽穗前與抽穗後葉鞘核蛋白均可結合，並於抽穗前後有差異性 (圖二十五) 一般來說，於 EMSA 膠體中造成移動能力 (mobility) 降低的因子有 (1) 蛋白質與核酸的大小; (2) 結核蛋白的個數; (3) 蛋白質的帶電性; (4) 核酸構型的改變等四種 (Fried, 1989)。使用粗萃取之細胞核蛋白進行 EMSA 實驗時，於鑑定結果上較純化蛋白複雜，探討我們實驗結果的可能解釋有三種：(1) 抽穗前有兩種 TF 競爭同一個結合區，抽穗後只有其中一種 TF；(2) 抽穗前有兩種調控蛋白，一個具有與 DNA 序列結合之能力，另一個具有與蛋白質結合之特性，抽穗後只剩下可與 DNA 結合之調控蛋白；(3) 抽穗前有兩種 TF，分別結合於不同調控區域，供源型葉鞘則只剩下其中一種 TF。未來藉由 Yeast One-hybrid 技術可以找出第一與第三種假設下之關鍵調控蛋白，而第二種假設之重要調控蛋白則需要搭配 DNA affinity column、2D EMSA 或是 mass spectrometry 等方法 (Woo et al., 2002; Stead et al., 2006)，來幫助鑑定結合蛋白之個數與種類。

我們於67 bp之DF(-550/-484)上比對到9個已知的*cis*-acting elements (圖二十四) (表九)，而其中WBBOXPCWRKY1、WBOXATNPR1與CURECORECR等三種僅存在於*OsSUT4*啟動子-484上游處。於前人研究中，WBBOXPCWRKY1 (TTTGACY) 及WBOXATNPR1 (TTGAC) 屬於與病原反應相關之調控區域 (Eulgem et al., 1999)，分別被發現在荷蘭芹*Pathogenesis-Related Class 10 (PR10)*、*WRKY1*與阿拉伯芥之*NPR1*基因啟動子上，而相對之*trans*-acting elements於前者為一促進子，於後者則為一抑制子。相同位置 (-512/-509) 之W box (TGAC) 也被認為是WBOXHVIS01、WBOXNTERF3與WRKY71OS等調控區，WBOXHVIS01為大麥SUSIBA1與SUSIBA2轉錄因子的DNA結合序列，與醣類調控有關 (Sun et al., 2003); WBOXNTERF3位於菸草抑制型轉錄因子*ERF3*啟動子中，參與此基因受傷誘導之調控路徑 (Nishiuchi et al., 2004); 而WRKY71OS於先前提過，位在 *α -amylase*基因啟動子上，於糊粉層細胞中扮演溝通GA及ABA訊息傳導之角色 (Zhang et al., 2004; Xie et al., 2005)。這些相對應之轉錄調控因子，於先前研究敘述均具不同調控特性與生理功能，而在葉鞘中是否也具有同樣表現特性，還需要更多實驗來佐證。WRKY是一非常龐大之轉錄因子基因家族，在水稻基因組中預測之WRKY基因已有一百多個，多數基因其功能都尚未清楚，不排除有未知WRKY基因於水稻葉鞘儲存-供源轉換時扮演調控之角色。CURECORECR調控區位於綠藻*cytochrome c6 (Cyc6)* 及 *coprogen oxidase (Cpx1)* 基因啟動子上，與缺氧反應及銅離子感應有關 (Lu and Stemler, 2002)，而在葉鞘中的功能仍須實驗證明。Schneidereit等人 (2008)曾於阿拉伯芥轉殖株中分析*AtSUC*基因不同長度啟動子活性，推測需要同時具有AAT(A/T)ATT (HD-Zip轉錄因子結合區) 與CTTT (DOF轉錄因子結合區) 兩種*cis*-acting element，才能調控*AtSUC*基因於供源型葉片大量表現。而在PSUT4中，並未發現任何HD-Zip轉錄因子結合區，暗示影響*OsSUT4*基因於供源型葉鞘大量表現的調控機制與*AtSUC*基因並不相同。另外，PSUT4之DF(-550/-484)區域中，與W box (-512/-509) 重疊一個反向的DOF轉錄因子結合區 (CTTT; -515/-512)，由前人

研究知道反向的 *cis*-acting element 也可能具有功能 (Schneidereit et al., 2008)，重疊的調控位置是否因此造成兩種轉錄因子共同競爭，仍須要更多實驗來證明。

7. 葉鞘組織暫時性表現系統之建立

為了檢測葉鞘基因槍暫時性表現系統之效率，我們分析水稻韌皮部專一表現基因 (*TRXh*) 之啟動子於成株水稻中的暫時性表現，結果顯示可於葉鞘組織中偵測到明顯的 GUS 活性 (圖十八 a)。另外，由 pCamPSUT4-DF (-843/-11)、pCamPSUT4-DF(-643/-11) 與 pCamPSUT4-DF(-434/-11) 三種長度啟動子片段之轉殖株活性分析，分別得到供源型葉鞘與儲存型葉鞘的活性比值為 4、2.4 與 1.1 倍 (圖三十)，而由基因槍進行暫時性表現所得之比值為 3.7、3.3 與 1.4 倍 (圖二十三 a)，兩種實驗方法之結果同時顯示，PSUT4-DF(-434/-11) 啟動子長度即失去於供源型葉鞘大量表現之活性，進一步證實葉鞘基因槍暫時性表現系統的正确性。

8. 結語與未來展望

本論文為瞭解水稻葉鞘於抽穗期間儲存 - 供源轉換的分子調控機制，首先篩選出參與水稻葉鞘儲存-供源轉換之標識基因，包含醣類代謝相關基因 (*AGP-L2*、*GBSSII*、*SSSI*、*SBEI*、*SBEIII*、*SBEIV*、*sucrose synthase* 與 β -*amylase*)、蔗糖轉運蛋白 (*OsSUT1* 與 *OsSUT4*) 及分子轉運蛋白 (*putative sorbitol transporter*、*ammonium transporter* 與 *phosphate transporter*) 等基因。藉由分析澱粉合成相關基因啟動子序列及荷爾蒙實驗，得知 ABA 雖然並非是誘導葉鞘儲存-供源轉變之主因，但其可能於供源型葉鞘中促進澱粉分解及蔗糖轉運蛋白基因表現。我們也發現葡萄糖與蔗糖含量於抽穗後上升的趨勢與蔗糖轉運蛋白表現量相似，暗示其極可能影響蔗糖轉運蛋白在葉鞘中的表現，而醣類分子與 ABA 之間是否對蔗糖轉運蛋白有共同協調的關係存在，未來可以利用荷爾蒙抑制劑的處理來佐證。利用啟動子分析來了解水稻蔗糖轉運蛋白於供源型葉鞘中表現的分子調控機制，得到一段 67 bp 之啟動

子序列，其可能包含調控蔗糖轉運蛋白於抽穗後大量表現的調控區域。未來，尋找這段啟動子片段上之結合轉錄因子以及證實該轉錄因子之調控特性將是首要工作，預期能藉此更了解水稻葉鞘儲存-供源轉換之分子調控機制，在未來，可以應用於增強水稻葉鞘於抽穗前儲存醣類之能力或抽穗之後之供源強度，以提高水稻產量及降低環境逆境對水稻減產之衝擊。



參考資料

- 陳佳宜 (2007) 水稻種子發芽時期胚中蔗糖轉運蛋白基因之表現調控機制。國立臺灣大學生物資源暨農學院農藝系碩士論文。
- Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D, Shinozaki K (1997) Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* **9**:1859–1868
- Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003) *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* **15**: 63–78
- Akihiro T, Mizuno K, Fujimura T (2005) Gene expression of ADP-glucose pyrophosphorylase and starch contents in rice cultured cells are cooperatively regulated by sucrose and ABA. *Plant Cell Physiol* **46**: 937–946
- Aloni B, Daie J, Wyse RE (1986) Enhancement of [¹⁴C]sucrose export from source leaves of *Vicia faba* by gibberellic acid. *Plant Physiol* **82**: 962-966
- Aoki N, Hirose T, Scofield GN, Whitfield PR, Furbank RT (2003) The sucrose transporter gene family in rice. *Plant Cell Physiol* **44**: 223–232
- Baba I, Kittaka A (1953) On the accumulation of starch grains at the shoot base of the rice plant. *Proc Crop Sci Soc Jpn* **22**: 43–44
- Barker L, Kuhn C, Weise A, Schulz A, Gebhardt C, Hirner B, Hellmann H, Schulze W, Ward JM, Frommer WB (2000) SUT2, a putative Suc sensor in sieve elements. *Plant Cell* **12**: 1153–1164
- Baroja-Fernandez E, Munoz FJ, Saikusa T, Rodriguez-Lopez M, Akazawa T, Pozueta-Romero J (2003) Sucrose synthase catalyzes the de novo production of ADPglucose linked to starch biosynthesis in heterotrophic tissues of plants. *Plant Cell Physiol* **44**: 500–509
- Blakeney AG, Matheson TH (1984) Some properties of the stem and pollen starches of rice. *Starch* **36**: 265–269
- Blum A, Sinmena B, Mayer J, Golan G, Shpiler L (1994) Stem reserve mobilization supports wheat-grain filling under heat stress. *Aust J Plant Physiol* **21**: 771–781
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248–254
- Braun DM, Slewinski TL (2009) Genetic control of carbon partitioning in grasses: roles of sucrose transporters and tie-dyed loci in phloem loading. *Plant Physiol* **149**: 71–81
- Burton RA, Bewley JD, Smith AM, Bhattacharyya MK, Tatge H, Ring S, Bull V, Hamilton WDO, Martin C (1995) Starch branching enzymes belonging to distinct enzyme families are differentially expressed during pea embryo development. *Plant J* **7**: 3–15
- Chen C, Chen Z (2002) Potentiation of developmentally regulated plant defense response by AtWRKY18, a pathogen-induced *Arabidopsis* transcription factor. *Plant Physiol* **129**: 706-16

- Chen HJ, Wang SJ** (2008) Molecular regulation of sink-source transition in rice leaf sheaths during the heading period. *Acta Physiol Plant* **30**: 639-649
- Chen WS, Liu HY, Yang ZH, Chen WH** (1994) Gibberellin and temperature influence carbohydrate content and flowering in *Phalaenopsis*. *Physiol Plant* **90**: 391–395
- Chincinska IA, Liesche J, Krügel U, Michalska J, Geigenberger P, Grimm B, Kühn C** (2008) Sucrose transporter StSUT4 from potato affects flowering, tuberization, and shade avoidance response. *Plant Physiol* **146**: 515–528
- Chiou TJ, Bush DR** (1998) Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 4784–4788
- Chu C and Lee TM** (1989) The relationship between ethylene biosynthesis and chilling tolerance in seedlings of rice (*Oryza sativa* L.). *Bot Bull Acad Sinica* **30**: 263–273
- Cock JH, Yoshida S** (1972) Accumulation of ¹⁴C-labelled carbohydrate before flowering and its subsequent redistribution and respiration in the rice plant. *Proc Crop Sci Soc Jpn* **41**: 226–234
- Denyer K, Dunlap F, Thorbjørnsen T, Keeling P, Smith AM** (1996) The major form of ADP-glucose pyrophosphorylase in maize (*Zea mays* L.) endosperm is extra-plastidial. *Plant Physiol* **112**: 779–785
- Dian WM, Jiang HW, Chen QS, Liu FY, Wu P** (2003) Cloning and characterization of the granule-bound starch synthase II gene in rice: gene expression is regulated by the nitrogen level, sugar and circadian rhythm. *Planta* **218**: 261–268
- Dian WM, Jiang HW, Wu P** (2005) Evolution and expression analysis of starch synthase III and IV in rice. *Journal of Experimental Botany* **56**: 623–632
- Ding B, Parthasarathy MV, Niklas K, Turgeon R** (1988) A morphometric analysis of the phloem-unloading pathway in developing tobacco leaves. *Planta* **176**: 307–318
- Edwards A, Borthakur A, Bornemann S, Venail J, Denyer K, Waite D, Fulton D, Smith A, Martin C** (1999) Specificity of starch synthase isoforms from potato. *Eur J Biochem* **266**: 724–736
- Endler A, Meyer S, Schelbert S, Schneider T, Weschke W, Peters SW, Keller F, Baginsky S, Martiñoia E, Schmidt UG** (2006) Identification of a vacuolar sucrose transporter in *Hordeum vulgare* and *Arabidopsis thaliana* by a tonoplast proteomic approach. *Plant Physiol* **141**: 196–207
- Eulgem T, Rushton PJ, Elmon Schmelzer E, Hahlbrock K, Somssich IE** (1999) Early nuclear event in plant defence: rapid gene activation by WRKY transcription factors. *EMBO J* **18**: 4689–4699
- Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE** (2000) The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci* **5**: 199-206
- Fried MG** (1989) Measurement of protein-DNA interaction parameters by electrophoresis mobility shift assay. *Electrophoresis* **10**: 366-376
- Furbank RT, Scofield G, Hirose T, Wang XD, Patrick J, Offler C** (2001) Cellular localisation and function of a sucrose transporter OsSUT1 in developing rice grains. *Aust J Plant Physiol* **28**: 1187–1196
- Gao Z, Maurousset L, Lemoine R, Yoo SD, Nocker S, Loescher W** (2003) Cloning, expression, and

- characterization of sorbitol transporters from developing sour cherry fruit and leaf sink tissues. *Plant Physiol* **131**: 1–10
- Ghosh HP, Preiss J** (1966) Adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase. A regulatory enzyme in the biosynthesis of starch in spinach leaf chloroplasts. *J Biol Chem* **241**: 4491–4504
- Guan HP, Preiss J** (1993) Differentiation of the properties of the starch branching isozymes from maize (*Zea mays*). *Plant Physiol* **102**: 1269–1273
- Hanggi E, Fleming AJ** (2001) Sucrose synthase expression pattern in young maize leaves: implications for phloem transport. *Planta* **214**: 326–329
- Harms K, Wöhner RV, Schulz B, Frommer WB** (1994) Isolation and characterization of P-type H(+)-ATPase genes from potato. *Plant Mol Biol* **26**: 979–988
- Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T** (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J* **6**: 271–282
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T** (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucleic Acids Res* **27**: 297–300
- Hirose T, Endler A, Ohsugi R** (1999) Gene expression of enzymes for starch and sucrose metabolism and transport in leaf sheaths of rice (*Oryza sativa* L.) during the heading period in relation to the sink to source transition. *Plant Prod Sci* **2**: 178–183
- Hirose T, Imaizumi N, Scofield GN, Furbank RT, Ohsugi R** (1997) cDNA cloning and tissue-specific expression of a gene for sucrose transporter from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiol* **38**: 1389–1396
- Hirose T, Ohdan T, Nakamura Y, Terao T** (2006) Expression profiling of genes related to starch synthesis in rice leaf sheaths during the heading period. *Physiol Plant* **128**: 425–435
- Hu CY, Chee PP, Chesney RH, Zhou JH, Miller PD, O'Brien WT** (1990) Intrinsic GUS-like activities in seed plants. *Plant Cell Rep* **9**: 1–5
- Hung WP, Lur HS, Liao CK, Kao CH** (1994) Role of abscisic acid, ethylene and polyamines in flooding-promoted senescence of tobacco leaves. *J Plant Physiol* **143**: 102–105
- Imlau A, Truernit E, Sauer N** (1999) Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. *Plant Cell* **11**: 309–322
- Ishikawa T, Akita S, Li Q** (1993) Relationship between contents of non-structural carbohydrates before panicle initiation stage and grain yield in rice (*Oryza sativa* L.). *Jpn J Crop Sci* **62**: 130–131
- Ishimaru K, Hirose T, Aoki N, Takahashi S, Ono K, Yamamoto S, Wu J, Saji S, Baba T, Ugaki M, Matsumotoi T, Ohsugi R** (2001) Antisense expression of a rice sucrose transporter OsSUT1 in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiol* **42**: 1181–1185
- Ishimaru K, Kosone M, Sasaki H, Kashiwagi T** (2004) Leaf contents differ depending on the position in a rice leaf sheath during sink–source transition. *Plant Physiol Biochem* **42**: 855–860
- Ishiwatari Y, Nemoto K, Fujiwara T, Chino M, Hayashi H** (2000) In situ hybridization study of the rice phloem thioredoxin h mRNA accumulation—possible involvement in the differentiation of vascu-

- lar tissues. *Physiol Plant* **109**: 90–96
- Itoh K, Yamaguchi J, Huang N, Rodriguez RL, Akazawa T, Shimamoto K** (1995) Developmental and hormonal regulation of rice α -amylase (RAmy1A)-gusA fusion genes in transgenic rice seeds. *Plant Physiol* **107**: 25–31
- Jefferson RA, Kavanagh T A, Bevan MW** (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* **6**: 3901–3907
- Jones H, Eagles JE** (1962) Translocation of 14 C carbon within and between leaves. *Ann Bot N S* **26**: 505–510
- Keppler D, Decker K** (1974) Glycogen: Determination with amyloglucosidase. In” Bergmeyer HU (ed) *Methods of enzymatic analysis*” vol 3. Academic Press, New York, pp 1127–1131
- Koch KE** (1996) Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**: 509–540
- Kossmann J, Abel GJ, Springer F, Lloyd JR, Willmitzer L** (1999) Cloning and functional analysis of a cDNA encoding a starch synthase from potato (*Solanum tuberosum* L.) that is predominantly expressed in leaf tissue. *Planta* **208**: 503–11
- Kumar A, Silim SN, Okamoto M, Siddiqi MY, Glass AD** (2003) Differential expression of three members of the AMT1 gene family encoding putative high-affinity NH_4^+ transporters in roots of *Oryza sativa* subspecies indica. *Plant Cell Environ* **26**: 907–914
- Kühn C, Hajirezaei MR, Fernie AR, Roessner-Tunali U, Czechowski T, Hirner B, Frommer WB** (2003) The sucrose transporter StSUT1 localizes to sieve elements in potato tuber phloem and influences tuber physiology and development. *Plant Physiol* **131**: 102–113
- Kühn C, Quick WP, Schulz A, Riesmeier JW, Sonnewald U, Frommer WB** (1996) Companion cell-specific inhibition of the potato sucrose transporter SUT1. *Plant Cell Environ* **19**: 1115–1123
- Lam E, Chua NH** (1989) ASF-2: A factor that binds to the cauliflower mosaic virus 35S promoter and a conserved GATA motif in cab promoters. *Plant Cell* **1**: 1147–1156
- Lao NT, Schoneveld O, Mould RM, Hibberd JM, Gray JC, Kavanagh TA** (1999) An *Arabidopsis* gene encoding a chloroplast-targeted β -amylase. *Plant J* **20**: 519–527
- Lazan H, Ng SY, Goh LY, Ali ZM** (2004) Papaya β -galactosidase/ galactanase isoforms in differential cell wall hydrolysis and fruit softening during ripening. *Plant Physiol Biochem* **42**: 847–853
- Lee SK, Hwang SK, Han M, Eom JS, Kang HG, Han Y, Choi SB, Cho MH, Bhoo SH, An G, Hahn TR, Okita TW, Jeon JS** (2007) Identification of the ADP-glucose pyrophosphorylase isoforms essential for starch synthesis in the leaf and seed endosperm of rice (*Oryza sativa* L.) *Plant Mol Biol* **65**: 531–546
- Lemoine R** (2000) Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochim Biophys Acta* **1465**: 246–262
- Loescher WH, Marlow GG, Kennedy RA** (1982) Sorbitol metabolism and sink-source interconversions in developing apple leaves. *Plant Physiol* **70**: 335–339

- Lu YK, Stemler AJ** (2002) Extrinsic photosystem II carbonic anhydrase in maize mesophyll chloroplasts. *Plant Physiol* **266**: 16746–16754
- Mae T, Ohira K** (1981) The remobilization of nitrogen related to leaf growth and senescence in rice plants (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiol* **22**: 1067–1074
- Matsukura C, Saitoh T, Hirose T, Ohsugi R, Perata P, Yamaguchi J** (2000) Sugar uptake and transport in rice embryo: expression of companion cell-specific sucrose transporter (OsSUT1) induced by sugar and light. *Plant Physiol* **124**: 85–93
- Matsuzaki A, Rutger JN** (1991) Characteristics relating young panicle development and heading of closely related calrose rice genotypes. *Jpn J Crop Sci* **60**: 298–305
- Meyer S, Truernit E, Hu"mmer C, Besenbeck R, Stadler R, Sauer N** (2000) AtSUC3, a gene encoding a new *Arabidopsis* sucrose transporter, is expressed in cells adjacent to the vascular tissue and in a carpel cell layer. *Plant J* **24**: 869–882
- Miyazawa Y, Sakai A, Miyagishima S, Takano H, Kawano S, Kuroiwa T** (1999) Auxin and cytokinin have opposite effects on amyloplast development and the expression of starch synthesis genes in cultured bright yellow-2 tobacco cells. *Plant Physiol* **121**: 461–469
- Mu"noz FJ, Baroja-Fernandez E, Moran-Zorzano MT, Viale AM, Etxeberria E, Alonso-Casajus N, Pozueta-Romero J** (2005) Sucrose synthase controls both intracellular ADP glucose levels and transitory starch biosynthesis in source leaves. *Plant Cell Physiol* **46**: 1366–1376
- Nakamura M, Tsunoda T, Obokata J** (2002) Photosynthesis nuclear genes generally lack TATA-boxes: a tobacco photosystem I gene responds to light through an initiator. *Plant J* **29**: 1–10
- Nakamura Y** (1996) Some properties of starch debranching enzymes and their possible roles in amylopectin biosynthesis. *Plant Sci* **121**: 1–18
- Nakamura Y** (2002) Towards a better understanding of the metabolic system for amylopectin biosynthesis in plants: rice endosperm as a model tissue. *Plant Cell Physiol* **43**: 718–725
- Nakamura Y, Yuki K, Park S, Ohya T** (1989) Carbohydrate metabolism in the developing endosperm of rice grains. *Plant cell Physiol* **30**: 833–839
- Nakata PA, Okita TW** (1995) Differential regulation of ADP-glucose pyrophosphorylase in the sink and source tissues of potato. *Plant Physiol* **108**: 361–368
- Ngampanya B, Takeda T, Sonoda Y, Narangajavana J, Yamaguchi J** (2002) Characterization of OsSUT2 cDNA expressed before flowering stage. *Rice Genet News* **19**: 49–51
- Nishi A, Nakamura Y, Tanaka N, Satoh H** (2001) Biochemical and genetic effects of amylose-extender mutation in rice endosperm. *Plant Physiol* **127**: 459–472
- Nishiuchi T, Shishi H, Suzuki K** (2004) Rapid and transient activation of transcription of the ERF3 gene by wounding in tobacco leaves: possible involvement of NtWRKYs and autorepression. *J Biol Chem* **279**: 55355–55361
- Nittyl" T, Messerli G, Trevisan M, Chen J, Smith AM, Zeeman SC** (2004) A novel maltose transporter is essential for starch degradation in leaves. *Science* **303**: 87–89

- Ohdan T, Francisco PB, Sawada T, Hirose T, Terao T, Satoh H, Nakamura Y** (2005) Expression profiling of genes involved in starch synthesis in sink and source organs of rice. *J Exp Bot* **56**: 3229–3244
- Perez CM, Palmiano EP, Baun LC, Juliano BO** (1971) Starch metabolism in the leaf sheaths and culm of rice. *Plant Physiol* **47**: 404–408
- Rook F, Corke F, Card R, Munz G, Smith C, Bevan MW** (2001) Impaired sucrose–induction mutants reveal the modulation of sugar–induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signaling. *Plant J* **26**: 421–433
- Ross EJH, Stone JM, Elowsky CG, Arredondo-Peter R, Klucas RV, Sarath G** (2004) Activation of the *Oryza sativa* non-symbiotic haemoglobin-2 promoter by the cytokinin-regulated transcription factor, ARR1. *J Exp Bot* **55**:1721–1731
- Salehuzzaman SNIM, Jacobsen E, Visser RGF** (1994) Expression patterns of two starch biosynthetic genes *in vitro* cultured cassava plants and their induction by sugars. *Plant Sci* **98**: 53–62
- Samonte SOPB, Wilson LT, McClung AM, Tarpley L** (2001) Seasonal dynamics of nonstructural carbohydrate partitioning in fifteen diverse rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. *Crop Sci* **41**: 902–909
- Sanford JC, Smith FD, Russell JA** (1993) Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Meth Enzymol* **217**: 483–509
- Sauer N** (2007) Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Lett* **581**: 2309–2317
- Scheible WR, González-Fontes A, Morcuende R, Lauerer M, Geiger M, Glaab J, Gojon A, Schulze ED, Stitt M** (1997) Tobacco mutants with a decreased number of functional *nia* genes compensates by modification the diurnal regulation of transcription, post-translational modification and turnover of nitrate reductase. *Planta* **203**: 304–319
- Schneidereit A, Imlau A, Sauer N** (2008) Conserved *cis*-regulatory elements for DNA-binding-with-one-finger and homeo-domain-leucine-zipper transcription factors regulate companion cell-specific expression of the *Arabidopsis thaliana* *SUCROSE TRANSPORTER 2* gene. *Planta* **228**: 651–662
- Scofield GN, Hirose T, Gaudron JA, Upadhyaya NM, Ohsugi R, Furbank RT** (2002) Antisense suppression of the rice sucrose transporter gene, OsSUT1, leads to impaired grain filling and germination but does not affect photosynthesis. *Funct Plant Biol* **29**: 815–826
- Scofield GN, Aoki N, Hirose T, Takano M, Jenkins CL, Furbank RT** (2007) The role of the sucrose transporter, OsSUT1, in germination and early seedling growth and development of rice plants. *J Exp Bot* **58**: 483–495
- Sheu JJ, Yu TS, Tong WF, Yu SM** (1996) Carbohydrate starvation stimulates differential expression of rice α -amylase genes that is modulated through complicated transcriptional and post-transcriptional processes. *J Biol Chem* **271**: 26998–27004
- Sikka VK, Choi S, Kavakli IH, Sakulsingharoj C, Gupta S, Ito H, Okita TW** (2001) Subcellular compartmentation and allosteric regulation of the rice endosperm ADP–glucose pyrophosphorylase. *Plant Sci* **161**: 461–468

- Sivitz, AB, Reinders, A and Ward, JM** (2008) Arabidopsis sucrose transporter AtSUC1 is important for pollen germination and sucrose-induced anthocyanin accumulation. *Plant Physiol* **147**: 92–100
- Smith AM, Denyer K, Martin C** (1997) The synthesis of the starch granule. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 67–87
- Smith AM, Zeeman SC, Smith SM** (2005) Starch degradation. *Annu Rev Plant Biol* **56**: 73–98
- Smith FW, Mudge SR, Rae AL, Glassop D** (2003) Phosphate transport in plants. *Plant Soil* **248**: 71–83
- Soga Y, Nozaki M** (1957) Studies on the relation between seasonal changes of carbohydrates accumulated and the ripening at the stage of generative growth in the rice plant and the grain ripening. *Proc Crop Sci Soc Jpn* **26**: 105–108
- Sokolov LN, Déjardin A, Kleczkowski LA** (1998) Sugars and light/dark exposure trigger differential regulation of ADP-glucose pyrophosphorylase genes in *Arabidopsis thaliana* (thale cress). *Biochem J* **336**: 681–687
- Sokolova SV, Balakshina NO, Krasavina MS** (2002) Activation of Soluble Acid Invertase Accompanies the Cytokinin-Induced Source-Sink Leaf Transition. *Russ J Plant Physiol* **49**:86-91
- Sonoda Y, Ikeda A, Saiki S, Yamaya T, Yamaguchi J** (2003) Feedback regulation of the ammonium transporter gene family AMT1 by glutamine in rice. *Plant Cell Physiol* **44**: 1396–1402
- Stead JA, Keen JN, McDowall KJ** (2006) The identification of nucleic acid-interacting proteins using a simple proteomics-based approach that directly incorporates the electrophoretic mobility shift assay. *Mol Cell Proteomics* **5**: 1697–1702
- Suenaga A, Moriya K, Sonoda Y, Ikeda A, Von Wiren N, Hayakawa T, Yamaguchi J, Yamaya T** (2003) Constitutive expression of a novel-type ammonium transporter OsAMT2 in rice plants. *Plant Cell Physiol* **44**: 206–211
- Sun CX, Palmqvist S, Olsson H, Boren M, Ahlandsberg S, Jansson C** (2003) A novel WRKY transcription factor, SUSIBA2, participates in sugar signaling in barley by binding to the sugarresponsive elements of the iso1 promoter. *Plant Cell* **15**: 2076–2092
- Takahashi S, Ishimaru K, Yazaki J, Fujii F, Shimbo K, Yamamoto K, Sakata K, Sasaki T, Kishimoto N, Kikuchi S** (2005) Microarray analysis of sink-source transition in rice leaf sheaths. *Breed Sci* **55**:153–162
- Takashi A, Mizuno K, Fujimura T** (2005) Gene expression of ADP-glucose pyrophosphorylase and starch contents in rice cultured cells are cooperatively regulated by sucrose and ABA. *Plant Cell Physiol* **46**: 937–946
- Takeda T, Toyofuku K, Matsukura C, Yamaguchi J** (2001) Sugar transporters involved in flowering and grain development of rice. *J Plant Physiol* **158**: 465–470
- Tanaka A** (1961) Studies on the nutritio-physiology of leaves of rice. *plant. J Fac Agric Hokkaido Univ* **51**: 449–550
- Thomas BR, Rodriguez RL** (1994) Metabolite signals regulate gene expression and source/sink relations in cereal seedlings. *Plant Physiol* **106**: 1235–1239

- Thorsteinsson B, Tillberg E, Ericsson T** (1990) Levels of IAA, ABA and carbohydrates in source and sink leaves of *Betula pendula*. Roth Scand J For Res **5**:347–354
- Toki S** (1997) Rapid and efficient Agrobacterium-Mediated transformation in rice. Plant Mol Biol Rep **15**: 16-21
- Turgeon R** (1989) The sink-source transition in leaves. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **40**: 119–38
- Turgeon R, Webb JA** (1975) Leaf development and phloem transport in *Cucurbita pepo*: carbon economy. Planta **123**: 53–62
- Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao S, Shinozaki K** (1993) An Arabidopsis myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. Plant Cell **5**: 1529–1539
- Varghese JN, Hrmova M, Fincher GB** (1999) Three-dimensional structure of a barley β -D-glucan exohydrolase, a family 3 glycosyl hydrolase. Structure **7**: 179–190
- Villain P, Mache R, Zhou DX** (1996) The mechanism of GT element-mediated cell type-specific transcriptional control. J Biol Chem **271**: 32593–32598
- Visser RGF, Somhorst I, Kuipers GJ, Ruys NJ, Feenstra WJ, Jacobsen E** (1991) Inhibition of the expression of the gene for granule-bound starch synthase in potato by antisense constructs. Mol Gen Genet **225**: 289–296
- Vrinten PL, Nakamura T** (2000) Wheat granule-bound starch synthase I and II are encoded by separate genes that are expressed in different tissues. Plant Physiol **122**: 255–263
- Wang AY, Kao MH, Yang WH, Sayion Y, Liu LF, Lee PD, Su JC** (1999) Differentially and developmentally regulated expression of three rice sucrose synthase genes. Plant Cell Physiol **40**: 800–807
- Wang MY, Siddiqi MY, Ruth TJ, Glass ADM** (1993) Ammonium uptake by rice roots. II. Kinetics of $^{13}\text{NH}_4^+$ influx across the plasmalemma. Plant Physiol **103**: 1259–1267
- Wang SJ, Yeh KW, Tsai CY** (2001) Regulation of starch granule-bound starch synthase I gene expression by circadian clock and sucrose in the source tissue of sweet potato. Plant Sci **161**: 635–644
- Wang SJ, Liu LF, Chen CK, Chen LW** (2006) Regulations of granule-bound starch synthase I gene expression in rice leaves by temperature and drought stress. Biol Plant **50**: 537–541
- Washio K** (2001) Identification of Dof proteins with implication in the gibberellin-regulated expression of a peptidase gene following the germination of rice grain. Biochim Biophys Acta **1520**: 54–62
- Washio K** (2003) Functional dissections between GAMYB and Dof transcription factors suggest a role for protein-protein associations in the gibberellin-mediated expression of the RAmy1A gene in the rice aleurone. Plant Physiol **133**: 850–863
- Watanabe Y, Nakamura Y, Ishii R** (1997) Relationship between starch accumulation and activities of the related enzymes in the leaf sheath as a temporary sink organ in rice (*Oryza sativa*). Aust J Plant Physiol **24**: 563–569
- Weber H, Borisjuk L, Wobus U** (1997) Sugar import and metabolism during seed development. Trends

Plant Sci **22**: 169–174

- Woo AJ, Dods JS, Susanto E, Ulgiati D, Abraham LJ** (2002) A proteomics approach for the identification of DNA binding activities observed in the electrophoretic mobility shift assay. *Mol Cell Proteomics* **1**: 472–478
- Wright KM, Roberts AG, Martens HJ, Sauer N, Oparka KJ** (2003) Structural and functional vein maturation in developing tobacco leaves in relation to *AtSUC2* promoter activity. *Plant Physiol* **131**: 1555–1565
- Xie Z, Zhang ZL, Zou XL, Huang J, Ruas P, Thompson D, Shen QJ** (2005) Annotations and functional analyses of the rice WRKY gene superfamily reveal positive and negative regulators of abscisic acid signaling in aleurone cells. *Plant Physiol* **137**: 176–189
- Yang J, Zhang J, Wang Z, Zhu Q** (2001a) Activities of starch hydrolytic enzymes and sucrose–phosphate synthase in the stems of rice subjected to water stress during grain filling. *J Exp Bot* **52**: 2169–2179
- Yang J, Zhang J, Wang Z, Zhu Q, Wang W** (2001b) Remobilization of carbon reserves in response to water deficit during grain filling of rice. *Field Crops Res* **71**: 47–55
- Yang J, Zhang J, Wang Z, Zhu Q** (2003) Hormones in the grains in relation to sink strength and post-anthesis development of spikelets in rice. *Plant Growth Regul* **41**: 185–195
- Yang J, Zhang J, Wang Z, Xu G, Zhu Q** (2004) Activities of key enzymes in sucrose–to–starch conversion in wheat grains subjected to water deficit during grain filling. *Plant Physiol* **135**: 1621–1629
- Yao LC, Shi JX, Goldschmidt EE** (2003) Sugars regulate sucrose transporter gene expression in citrus. *Biochem Biophys Res Commun* **306**: 402–407
- Yoshida S** (1972) Physiological aspects of grain yield. *Annu Rev Plant Physiol* **3**: 437–464
- Zhang ZL, Xie Z, Zou X, Casaretto J, Ho TH, Shen QJ** (2004) A rice WRKY gene encodes a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway in aleurone cells. *Plant Physiol* **134**: 1500–1513
- Zhang LE, Zhang P** (2005) Adjustment of plant growth regulators in source–sink relationship during grain filling of winter wheat. *Acta Agri Nucl Sinica* **19**: 228–231
- Zeeman SC, Umemoto T, Lue WL, Au–Yeung P, Martin C, Smith AM, Chen J** (1998) A mutant of *Arabidopsis* lacking a chloroplastic isoamylase accumulates both starch and phytyglycogen. *Plant Cell* **10**: 1699–1712

表一、針對澱粉合成、澱粉分解相關基因及蔗糖轉運蛋白設計進行 real-time RT-PCR 之專一性引子

Table 1、Primers for analyzing starch synthesis, starch degradation and sucrose transport-related gene expression by real-time RT-PCR

Gene	Accession number	primer (5' → 3')	Amplicon Size (bp)
<i>AGP-L1</i>	U66041	F- CGGGACCGTCATATAAAAGCA R- TCCCATTCCAAAACAAACCA	242
<i>AGP-L2</i>	D50317	F- TCTTGAGGACTATTACAAGCA R- GTCCATAGTCAGATGCTCGA	170
<i>AGP-S1</i>	AY028315	F- GGCAGCATGGAATAAACCCAC R- AGAATGCTCGTATTGGAGAAAATG	249
<i>AGP-S2</i>	J04960	F- TCCCAAAACATCTGAAAAGCA R- TGTCCAAGAAGCTGCAAGAGA	270
<i>GBSSI</i>	AF515482	F- CACTACAACAAACAAACCACTG R- GCGAAGAAGCTGGGAGAATG	200
<i>GBSSII</i>	AY069940	F- ACAGGCAAATGCATGCCATC R- AACTGCATGGCTCAAGAGCT	350
<i>SSSI</i>	D38221	F- GAAAGACAGGAAGATTGAGGG R- CGACATACAGGGAACACAAG	196
<i>SSSII-1</i>	AF383878	F- CGTCTGGAAGCTCATCAAGA R- TGCCCGTTCTGTTCTTGTC	195
<i>SSSII-2</i>	AF395537	F- TCTTGTCCAGTGCAGCCTT R- TGCGAAGCAAAATGGAGAG	148
<i>SSSII-3</i>	AF419099	F- GGAGCACTCTCAACAACCTTT R- CTCTCTCCGTCACCGTCAG	205
<i>SSSIII</i>	AF432915	F- TTCAACCAAGAAGTCCTCAA R- GCTGCAAACTCCATATACCC	152
<i>SSSIV-1</i>	AY100470	F- CAATCCCACCTCTCCTAACC R- AGCTTACAGTACGAAAACC	548
<i>SSSIV-2</i>	AY100471	F- TCTCACTAAACCGCCAGAG R- AAGCCTGAGGCCTGGAAAC	146
<i>SBEI</i>	D11082	F- TCTCCCCACTTGTGCTTC R- GCCCTAACTCATTCAAAGTCC	153
<i>SBEIII</i>	D16201	F- CGCAAAGCACAAAAGCAAG R- TGAGAACACCAAGAGGCAG	150
<i>SBEIV</i>	E14723	F- TGGAGCCTGCACAGCAAAC R- TTGAGGAGGAGGAAGAGATT	599
<i>DBE</i>	D50602	F- CGTGTGGACAGACATTGAAG R- AAGTGACATTGAGCAAAGGG	164
<i>Actin</i>	AB047313	F- AATCACAAGTGAGAACCACAG R- GAATGCTAAGCCAAGAGGAG	170
<i>Ubiquitin</i>	D12629	F- CGCAAGTACAACCAGGACAA R- TGTTGCTGTGACCACACTT	101
<i>β-amylase</i>	AK068968	F- TCAATCAAACAGAGACAGACAG R- AACCTCACAATCCCGTTC	222
<i>α-amylase 1A</i>	X16509	F- AATTGCATCCGTAATTCGGA R- CACGATGACGAGACTCTCA	77
<i>α-amylase 2A</i>	M74177	F- ACGTACCTTTGAAGGTAG R- GCCGATCATCGCACCT	114

(接續表一)

Gene	Accession number	primer (5'→ 3')	Amplicon Size (bp)
<i>α-amylase 3E</i>	M59352	F- AAACGAACAGTAGCTAGTTA R- GCTATGAATCATGCAATTTT	168
<i>OsSUT 1</i>	D87819	F- CTGTGATTTTCCTGTCCCTG R- AACACTGCTAGTGGACCAGT	136
<i>OsSUT 2</i>	AB091672	F- AGGAGGAGAGGTCACCGATAA R- CCAACATCCAATGTACAACAGCA	240
<i>OsSUT 3</i>	AB071809	F- GCCCAAGGTCTCCGTCC R- TGCTATAGTACCCGCTCTAA	137
<i>OsSUT 4</i>	AB091673	F- TTTGGCTGAGCAGAACACCA R- ATGTCATTCCGGCAGAGCTT	249
<i>OsSUT 5</i>	AB091674	F- CTAGTGCGAAACTCCATCAA R- AAAATATTTGGGTTTCCTGAGAT	250
<i>OsWRKY71</i>	AY541677	F- GACCAAGGATTGACGATTGC R- AAGAACAGAGAGGCAGAGAC	110
<i>OsDOF3</i>	AB028131	F- TGTTGCTAGCTTCTTGGAAAT R- CCTTTTGCATGGTTCCATGA	220



表二、水稻-2 葉鞘於抽穗期間澱粉合成相關基因表現與澱粉含量之相關分析
 收集抽穗前 20 天至抽穗後 20 天水稻葉鞘 (時間點分別為抽穗前 20、15、10、5 天及抽穗後 0、10、15、20 天), 以 real-time RT-PCR 偵測澱粉合成相關基因之 mRNA 表現量後, 與同時時間點之澱粉含量進行相關性分析。^a r 代表基因轉錄表現量和澱粉含量的相關係數。* 及 ** 分別表示顯著相關 $p < 0.05$ 與 $p < 0.01$ 。

Table 2、Correlation between mRNA levels of starch synthesis-related genes and starch content in -2 leaf sheath during heading period. The expression levels of starch synthesis-related genes were detected by real-time RT-PCR and were analyzed the relationships with starch content in leaf sheath. (sampling day : -20, -15, -10, -5, 0, 10, 15, 20 days after heading) ^a r indicated the correlation coefficient of gene transcript level and starch content. *, ** indicated significant correlation at the $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

ADP-glucose pyrophosphorylase		Starch synthase		Branching enzyme and debranching enzyme	
Gene	r^a	Gene	r^a	Gene	r^a
<i>AGP-L1</i>	-0.27	<i>GBSSII</i>	0.88**	<i>SBEI</i>	0.84**
<i>AGP-L2</i>	0.88**	<i>SSSI</i>	0.69*	<i>SBEIII</i>	0.86**
<i>AGP-S1</i>	0.53	<i>SSSII-1</i>	0.23	<i>SBEIV</i>	0.81**
<i>AGP-S2</i>	0.44	<i>SSSII-2</i>	0.52	<i>DBE</i>	0.06
		<i>SSSIII</i>	0.34		
		<i>SSSIV-1</i>	-0.06		
		<i>SSSIV-2</i>	-0.44		

表三、針對 Microarray 所篩選出之基因設計進行 Real-time RT-PCR 或半定量 RT-PCR 之專一性引子

Table 3、Primers for analyzing signaling and transcriptional regulation, carbohydrate metabolism and glycosylated modification, developmental regulation, hormone synthesis and signaling, molecule transport-related gene expression by real-time RT-PCR and semi-quantitative RT-PCR.

Gene	Accession number	primer (5' → 3')	Amplicon Size (bp)
Genes with some function related to signaling and transcriptional regulation			
<i>AP2-related transcription factor</i>	AK073812	F- TGACGAGTTCCAGGCAATC R- CAAAACCTCACCACATTTAC	99
<i>DRE-binding protein 1B</i>	AK062422	F- TCGCACTGAAAAGTGTGG R- CATTCAAATCAGATGGAAT	178
<i>DNA-binding protein ABF2</i>	AK058773	F- TCTCTGCCTCTCTGTTCTTG R- ACAGCGAATCATCAATTCCTC	115
<i>EF-hand Ca²⁺-binding protein CCD1</i>	AK111852	F- TCTCCTCTTCTCCTCCTCTC R- ATCATCTGCTGCTGCTGTC	119
<i>NPK1-related protein kinase-like protein</i>	AK071585	F- TCGAATCCTCCATTAGGCAG R- CGAATCTCACTGATTCAGTCC	108
<i>Putative B regulatory subunit of PP2A</i>	AK069462	F- TGAAGGCAAAGCATGTATCG R- TTGCAAGCACACCAGATG	199
<i>Plasma membrane Ca²⁺-ATPase</i>	AK065088	F- AGCAACAGTGGCTCATCAGC R- TGGTGTGTGGTTTACGGC	129
<i>Receptor serine/threonine kinase</i>	AK099657	F- TTCTTCCAAACTGTGTGCG R- CTCCTTCTCATCTCTCTC	247
<i>Putative guanylate cyclase</i>	AK102175	F- AATGCAATCCCAGCCCACTTAC R- TTGAGGTTTTACAAGGAGCCC	161
<i>Abscisic acid- and stress-inducible protein</i>	AK064892	F- TTTTCACAAGAGTCTCCGGC R- TTGGACACACAGAGGGCAAG	108
Genes with some function related to carbohydrate metabolism and glycosylated modification			
<i>β-amylase</i>	AK068968	F- AACCTCACAATCCCCTTC R- TGAATCAAACAGAGACAGACAG	222
<i>UDP-glucose- glucosyltransferase</i>	AK105783	F- CAACATCGATAGGCTCATCGAC R- CCTTCCGACTTATTCTGGTGTG	140
<i>β-galactosidase mRNA</i>	AK102192	F- CCGAGACGAATTTAGAGATG R- TTAGCAGTTGGTCACTCTGA	220
<i>sucrose synthase</i>	AK100334	F- AGGCTGAGACTCTGAAAGAG R- AGAGACCAACCACACACCA	220
<i>Endo-1,3-1,4-beta-D-glucanase</i>	AK067264	F- GGCGACCTTACAATGGAGAC R- CGATGAAGGATGGGAGATGAC	221
<i>β-glucosidase</i>	AK059517	F- GTAGTGGATGCCAGCAGTAT R- CACTGAAACACACAATAGCG	180
<i>Xyloglucan endotransglycosylase-like protein</i>	AK060654	F- TGTCTACAACACTACTGCGCC R- GCGGCAATAGTAATTCACCA	265
<i>Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase</i>	AK070279	F- CCACATTCGCTTGTGTCATC R- CCAGTCCAACCAACACATC	149
<i>β-D-glucan exohydrolase</i>	AK065044	F- AAGGCAGAGGAGAGGGAAAG R- GCACACACATACATACAGCAC	211
<i>Snf1</i>	AK068637	F- AGCTATGATCTCCAGCTCCC R- TTCTTTGTTGCTTCGCC	278

(接續表三)

Genes with some function related to developmental regulation				
<i>Early proembryo mRNA</i>	AK109648	F-	CCAGTACGAATACGAACCG	109
		R-	TGCCACAAGCCAGTTATCC	
<i>Homeodomain leucine zipper protein</i>	AK109177	F-	TGGACAGAGAGGGAAAAGAG	135
		R-	GCACCATCCAAAACACAAA	
<i>Floral organ regulator 2</i>	AK101897	F-	TGTAGTACACGGTACGACG	200
		R-	ACACACACTTGCATCATCATC	
<i>Putative dormancy-associated protein</i>	AK060981	F-	TCTCTGTCACGCCACGTTTG	
		R-	CGCTGAAAGTAGGGAAACAC	177
Genes with some function related to hormone synthesis and signaling				
<i>aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (ACO1)</i>	AK061064	F-	GCTTGATAGCGTGTGTACC	113
		R-	GTAGAAAACGCGAGCTGAG	
Genes with some function related to molecule transport				
<i>Ammonium transporter</i>	AK107601	F-	ATGCTTTTGCCGCTCTCTC	137
		R-	TTCCACCTTCACACCACAC	
<i>Phosphate transporter</i>	AK063990	F-	CATTGCAAATTGCAGCGAG	232
		R-	ACGAGGGAGATGGAGAAGAG	
<i>Putative sorbitol transporter</i>	AK073216	F-	GACACCGTCAAACCTCTTCG	179
		R-	TAGTAGCCCTCACTGGTCAC	
<i>Zinc transporter</i>	AK069804	F-	TTCAACTCAGCCTCAGCAG	148
		R-	TTGACATCAGTCCAGCACC	
<i>Phospholipid transporter</i>	AK062529	F-	GTCCTACGTCAACAACACC	193
		R-	ATCAAACATCGGTACTIONG	
<i>ABC transporter</i>	AK072452	F-	AGTGGTGGTGAGAAGAGGAG	251
		R-	GCCAGCCCAAAGTAAACAG	

表四、以 real-time RT-PCR 分析由 Microarray 所篩選出基因在抽穗期間之表現
 收集抽穗前 14 天到抽穗後 14 天的水稻葉鞘 (採收時間點為抽穗前 14、7 天及抽穗
 後 0、7 及 14 天，分別定義為 Stage1~5)，以 real-time RT-PCR 偵測 Microarray 所
 挑選出來之基因在這段期間的表現。

Table 4、The expression levels of genes have been selected from Microarray. Ex-
 pression patterns of microarray-selected genes were detected by real-time RT-PCR in
 leaf sheaths during heading period (sampling day : -14, -7, 0, 7, 14 days after heading).

Category and putative gene function	Accession No.	Microarray ratio ²	real-time RT-PCR ³				
			Stage1	Stage2	Stage3	Stage4	Stage5
Genes with some function related to signaling and transcriptional regulation							
WRKY transcription factor 50 (OsWRKY77)	AK108522	4.27			ND ¹		
AP2-related transcription factor	AK073812	3.25	0.1193	0.1593	0.0962	0.1348	0.2033
DRE-binding protein 1B	AK062422	6.00	0.00030	0.00019	0.00024	0.00014	0.00016
DNA-binding protein ABF2 (OsWRKY 71)	AK058773	8.87	0.0031	0.0031	0.0030	0.0040	0.0061
EF-hand Ca ²⁺ -binding protein CGD1	AK111852	4.75	0.2133	0.3223	0.4293	0.7337	0.8950
NPK1-related protein kinase-like protein	AK071585	6.36	0.0137	0.0153	0.0153	0.0225	0.0211
phosphatase 2C	AK069274	3.25			ND		
phosphatase 2C	AK063334	4.30			ND		
B regulatory subunit of protein phosphatase 2A	AK069462	0.27	0.0000159	0.0000173	0.0000160	0.0000143	0.0000112
Plasma membrane Ca ²⁺ -ATPase (SCA1)	AK065088	0.32	0.4907	0.5270	0.4847	0.4560	0.4660
Receptor serine/threonine kinase	AK099657	0.29	0.0056	0.0062	0.0054	0.0063	0.0067
Abscisic acid- and stress-inducible protein	AK064892	0.305	0.0005	0.0008	0.0010	0.0003	0.0003
Putative guanylate cyclase	AK102175	0.33	0.4158	0.1380	0.0993	0.1659	0.0842

(接續表四)

Category and putative gene function	Accession No.	Microarray ratio	real-time RT-PCR				
			Stage1	Stage2	Stage3	Stage4	Stage5
Genes with some function related to carbohydrate metabolism							
Beta-amylase	AK068968	3.63	0.1187	0.0724	0.1056	0.2033	0.1926
UDP-glucose glucosyltransferase	AK105783	3.33	0.8753	0.6483	0.9893	1.1353	1.3160
beta-galactosidase mRNA	AK102192	0.20	0.000008	0.000019	0.000014	0.000004	0.000002
BSUS1b sucrose synthase 2	AK100334	0.15	1.647	1.927	2.327	0.819	1.320
Endo-1,3-1,4-beta-D-glucanase	AK067264	0.32	0.0111	0.0202	0.0163	0.0138	0.0106
Beta-glucosidase	AK059517	0.25	0.0097	0.0223	0.0065	0.0073	0.0050
Xyloglucan endotransglycosylase-like protein	AK060654	0.20	0.0491	0.0635	0.0276	0.0289	0.0224
Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase	AK070279	0.26	0.0027	0.0025	0.0012	0.0011	0.0006
Beta-D-glucan exohydrolase	AK065044	0.31	0.0710	0.1024	0.0485	0.0424	0.0369
Snf1	AK068637	0.17	0.0008	0.0011	0.0007	0.0007	0.0005
Genes with some function related to developmental regulation							
Early proembryo mRNA	AK109648	3.56	379.17	363.33	982.30	390.67	587.67
Floral organ regulator 2 (FOR2)	AK101897	0.18	0.000029	0.000268	0.000064	0.000057	0.000022
Putative dormancy-associated protein	AK060981	0.26	3.5267	4.8500	3.2033	3.6000	3.3733
Homeodomain leucine zipper protein	AK109177	3.63	0.1463	0.0592	0.0883	0.1678	0.3547
Genes with some function related to hormone transport, metabolism and signaling							
1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	AK061064	4.313			RT-PCR assay		
Genes with some function related to molecule transport							
Ammonium transporter	AK107601	0.294	0.4790	0.4437	0.6927	1.4243	7.5697
Phosphate transporter	AK063990	3.4	0.1016	0.1104	0.1490	0.2440	0.2463
Putative sorbitol transporter	AK073216	5.00	0.5292	0.4603	0.5663	0.7613	1.0803
Zinc transporter	AK069804	0.217	0.0008	0.0009	0.0005	0.0005	0.0005
Phospholipid transfer protein	AK062529	0.273	0.0017	0.0015	0.0009	0.0009	0.0009
ABC transporter protein	AK072452	0.172	0.0125	0.0104	0.0184	0.0068	0.0074

¹ND 表示未進行 real-time RT-PCR 偵測之基因。²Microarray ratio：為供源期葉鞘中的基因表現量與儲存其葉鞘中基因表現量之比值。³Real-time RT-PCR：表示其基因與 *ubiquitin* 基因之相對表現量。

¹ND indicated the genes without detecting by real-time RT-PCR. ²Microarray ratio：The ratio of transcript levels in source leaf sheath to sink leaf sheath. ³Real-time RT-PCR：The relative quantity of mRNA expression levels to *ubiquitin* gene.

表五、澱粉合成相關基因之啟動子序列比對

下表顯示 *AGP-L2*、*GBSSII*、*SSSI*、*SBEI*、*SBEIII* 與 *SBEIV* 六個澱粉合成關鍵基因啟動子上，共同具有之 *cis-acting elements*。

Figure 5、The common *cis-acting elements* were shared by *AGP-L2*、*GBSSII*、*SSSI*、*SBEI*、*SBEIII* and *SBEIV* promoters.

Name of <i>cis-acting element</i>	Consensus sequence ^a	Description
Hormone signal-related		
ARR1AT	NGATT	Cytokinin-regulated transcription factor, ARR1, binding site
DOFCOREZM	AAAG	Dof transcription factor binding site
MYBCORE	CNGTTR	Dehydration stress-induced transcription factor, MYB, binding site
MYCCONSENSUSAT	CANNTG	Dehydration-responsive transcription factor, MYC, binding site
WRKY71OS	TGAC	Gibberellin-regulated transcription repressor, WRKY71, binding site
Light signal-related		
GT1CONSENSUS	GRWAAW	Light-regulated transcription factor, GT-1, binding site
INRNTPSADB	YTCANTYY	Light-responsive transcription factor, psaDb, binding site
GATABOX	GATA	GATA transcription factor family binding site
Others		
GTGANTG10	GTGA	Found in promoter of late pollen gene 10
POLLEN1LELAT52	AGAAA	Found in promoter of late pollen gene 52
NODCON2GM/ OSE2ROOTNODULE	CTCTT	Putative nodulin consensus sequences
EBOXBNNAPA	CANNTG	Motif present on napA storage protein gene promoter
CACTFTPPCA1	YACT	Mesophyll specific motif
CAATBOX1	CAAT	CAAT promoter consensus sequence
ROOTMOTIFTAPOX1	ATATT	Motif found both in promoters of roID

^a 序列中的 N 表示其鹼基可以為 A、T、C 或 G，R 表示其可以為 A 或 G。W 則代表序列可以是 A 或 T，Y 則是指 C 或 T 序列。

^a N=A/T/C/G, R=A or G, W=A or T, Y=C or T

表六、設計合成 *OsSUTs* 與 *TRXh* 基因啟動子之專一性引子

Figure 6、Primers for amplifying *OsSUTs* and *TRXh* gene promoters by genomic PCR.

Gene Primer Name	Position	primer (5' → 3')	Amplicon Size (bp)
<i>OsSUT1</i>			
PSUT1-F1	-1972	CCGACCGAATTGAATCGAG	903 (with PSUT1-R5)
PSUT1-R5	-1070	ATACCGTAATCAACGCATC	
PSUT1-F4	-1189	TATCTCGACGTAGCCAGAGAGC	1076 (with PSUT1-R6)
PSUT1-R6	-114	AGGGGGAGATGGAAATGGAAAG	
PSUT1-F5	-200	CCAAACACAAACCCACCAC	191 (with PSUT1-R4)
PSUT1-R4	-10	GCCACGCACAAACACAAACC	
PSUT1-R2	280	AGTGTGCAAATACACAGGAG	480 (with PSUT1-F5)
PSUT1-F1- <i>Sac</i> I	-1972	<u>GAGCTC</u> CCGACCGAATTGAA	1961 (with PSUT1-R4- <i>Sma</i> I)
PSUT1-R4- <i>Sma</i> I	-10	<u>CCCGGG</u> GCCACGCACAAACA	
<i>OsSUT2</i>			
PSUT2-F1	-830	TTAAGGAGCACCAAATGAGC	834 (with PSUT2-R2)
PSUT2-R2	+4	gcatCTTCTTCTCGTGTGTTGC	
PSUT2-F1- <i>Sac</i> I	-830	<u>GAGCTC</u> TTAAGGAGCACCAA	830 (with PSUT2-R2- <i>Sma</i> I)
PSUT2-R2- <i>Sma</i> I	-1	<u>CCCGGG</u> CTTCTTCTCGTGT	
<i>OsSUT4</i>			
PSUT4-F1	-843	GTGTGCCTTTTTCTGTCGG	833 (with PSUT4-R4)
PSUT4-R4	-11	AGATCTGGTAGGGTTTGGTG	
PSUT4-F4	-30	CACCAAACCCTACCAGATCT	322 (with PSUT4-R2)
PSUT4-R2	+292	AAGGGAGAGCAAAGGGTAG	
PSUT4-F1- <i>Sac</i> I	-843	<u>GAGCTC</u> GTGTGCCTTTTTCT	833 (with PSUT4-R4- <i>Sma</i> I)
PSUT4-R4- <i>Sma</i> I	-11	<u>CCCGGG</u> AGATCTGGTAGGGT	
<i>TRXh</i>			
PTRXh-F	-1018	<u>GAGCTC</u> ATCTAAAATGGGAATA	1007 (with PTRXh-R)
PTRXh-R	-12	<u>CCCGGG</u> CTCCTAATTCCTC	

表七、設計專一性引子，合成 *OsSUT4* 啟動子之片段與 EMSA 之 DNA 探針

Table 7、Primers for amplifying *OsSUT4* promoter fragments and EMSA DNA probes by PCR.

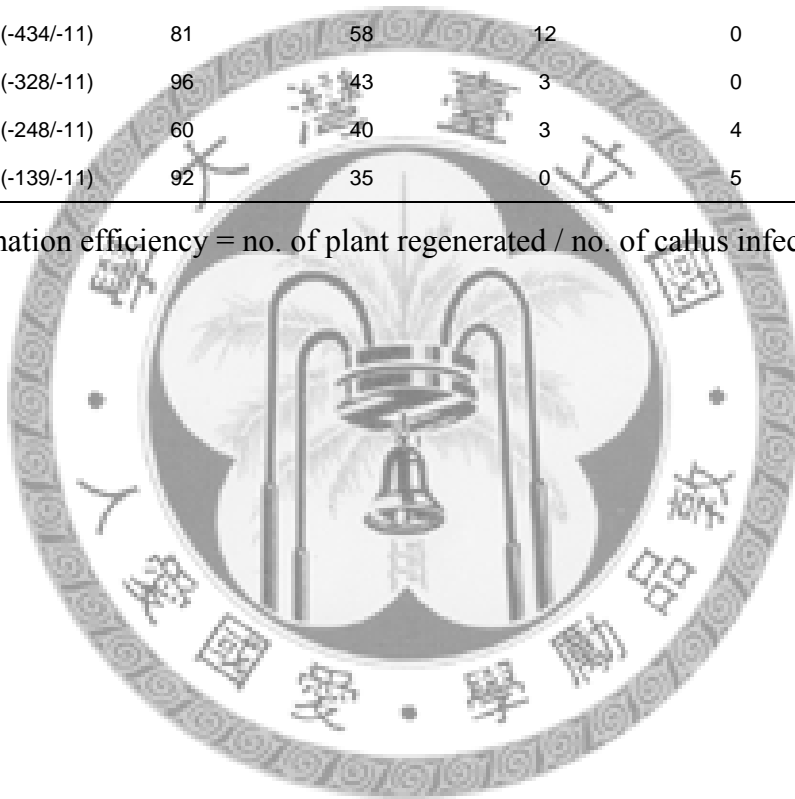
Primer Name	Position	primer (5'→3')	Amplicon Size (bp)
<i>OsSUT4</i> 啟動子 5'端 deletion 專一性引子			
PSUT4-DF2-Sac I	-643	<u>GAGCTC</u> GGTAACGTTGAGTGAT	633 (with PSUT4-R4-Sma I)
PSUT4-DF2a-Sac I	-602	<u>GAGCTC</u> AGAAGATGATGCCT	592 (with PSUT4-R4-Sma I)
PSUT4-DF3-Sac I	-550	<u>GAGCTC</u> CCATTGTGGTGATTCA	540 (with PSUT4-R4-Sma I)
PSUT4-DF3a-Sac I	-483	<u>GAGCTC</u> CAAACACGCATGAA	473 (with PSUT4-R4-Sma I)
PSUT4-DF4-Sac I	-434	<u>GAGCTC</u> AGCACTCCTAGTTTCA	424 (with PSUT4-R4-Sma I)
PSUT4-DF5-Sac I	-328	<u>GAGCTC</u> AGTTTCACATGGAGG	318 (with PSUT4-R4-Sma I)
PSUT4-DF6-Sac I	-248	<u>GAGCTC</u> TTGTCTTCCTCTGGCT	238 (with PSUT4-R4-Sma I)
PSUT4-DF7-Sac I	-139	<u>GAGCTC</u> GAGGAGACAATTTCCCT	129 (with PSUT4-R4-Sma I)
PSUT4-R4-Sma I	-11	<u>CCCGGG</u> GAGATCTGGTAGGGT	
EMSA DNA 探針設計專一性引子			
PSUT4-DF2-Biotin	-643	Bio-GGTAACGTTGAGTGATCA	41 (with PSUT4-DR2)
PSUT4-DR2	-603	TTTTGCTCCAGCAAGCCT	
PSUT4-DF3-Biotin	-550	Bio-CCATTGTGGTGATTCATG	67 (with PSUT4-DR3)
PSUT4-DR3	-484	GTAGCAGTCCACTCCATT	

表八、*OsSUT4* 基因不同長度啟動子於 TNG67 水稻之轉殖效率

Figure 8、Transformation efficiency of transgenic TNG 67 rice introduced with different length of *OsSUT4* promoter fragments.

Plasmid	No. of callus infection	No. of hygromycin resist. Calli	No. of normal plant regenerated	No. of etiolated plant regenerated	Transformation efficiency (%) ^a
pCamPSUT4-DF(-843/-11)	145	48	4	5	6.2
pCamPSUT4-DF(-643/-11)	123	70	12	0	9.8
pCamPSUT4-DF(-550/-11)	71	24	0	3	4.2
pCamPSUT4-DF(-434/-11)	81	58	12	0	14.8
pCamPSUT4-DF(-328/-11)	96	43	3	0	3.1
pCamPSUT4-DF(-248/-11)	60	40	3	4	11.7
pCamPSUT4-DF(-139/-11)	92	35	0	5	5.4

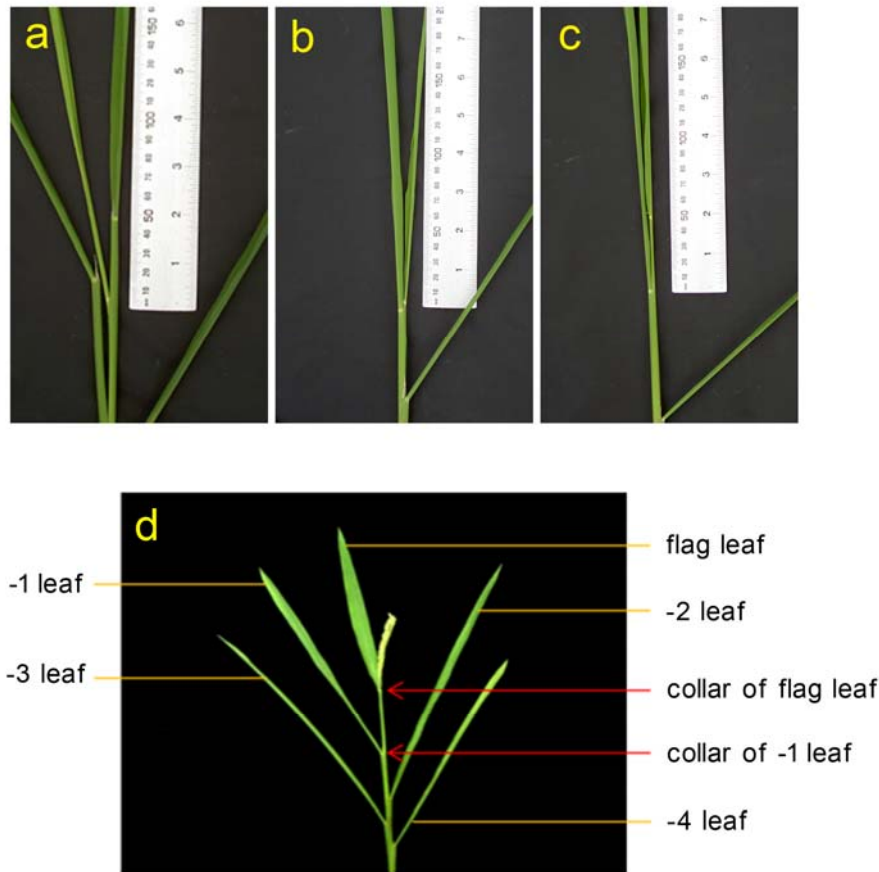
^a Transformation efficiency = no. of plant regenerated / no. of callus infection



表九、*OsSUT4* 基因啟動子 DF(-550/-484)片段上已知 *cis*-acting elements

Table 9、Description of *cis*-elements within the DF(-550/-484) fragment of *OsSUT4* promoter.

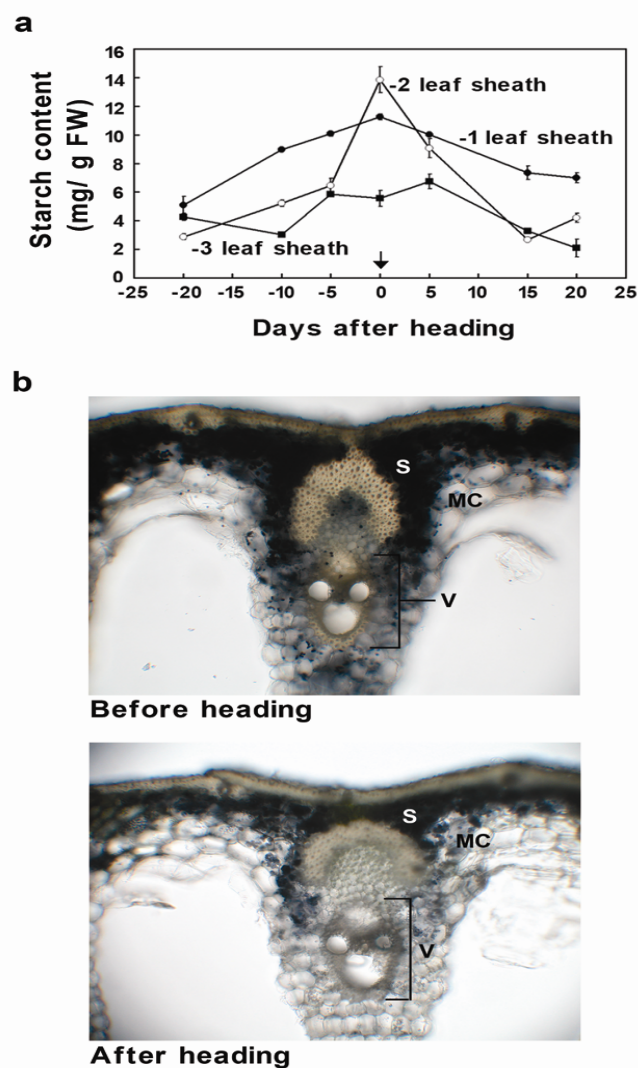
Name of <i>cis</i> -acting element	Description	Corresponding <i>trans</i> -element	References
ARR1AT	Cytokinin-responsive element	ARR1	Ross et al., 2004
CACTFTPPCA1	<i>Cis</i> -regulatory elements for mesophyll-specific gene expression		
CURECORECR	Copper-response element		
GTGANTG10	Found in promoter of late pollen gene 10		
NODCON2GM/	Putative nodulin consensus sequences		
OSE2ROOTNODULE			
WBOXPCWRKY1	Found in promoter of amylase genes in wheat, barley and oat	WRKY1	Eulgem et al., 2000
WBOXATNPR1	salicylic acid (SA)-responsive element	AtWRKY18	Chen and Chen, 2002
WBOXHVISO1	sugar-responsive elements	SUSIBA2	Sun et al., 2003
WBOXNTERF3	Wounding-responsive elements	WRKY	Nishiuchi et al., 2004
WRKY71OS	GA- and ABA-responsive element	WRKY71	Zhang et al., 2004



圖一、水稻生長發育階段之觀察方式

水稻葉鞘材料抽穗前採收天數以劍葉葉環與-1葉葉環距離來判斷，於冬季生長的植株，兩葉葉環距離為 -4 ± 1 、0及 4 ± 1 公分時，分別代表植株狀態為抽穗前15、10和5天 (a-c)，而夏季生長的植株則為抽穗前20、15及10天。水稻生長的最後一片葉片稱為劍葉，以下類推依序稱為-1、-2、-3及-4葉葉片 (d)。

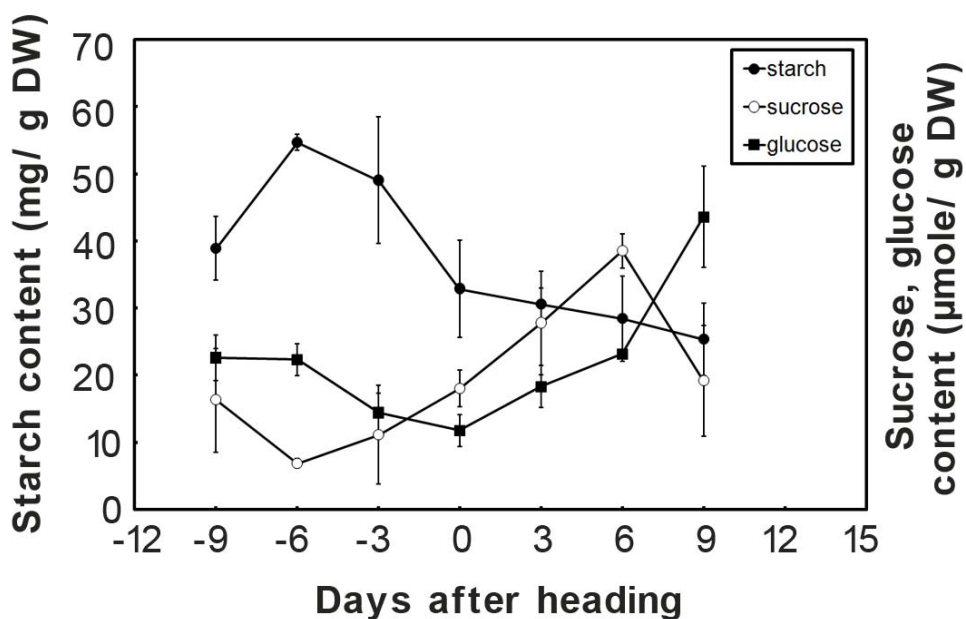
Figure 1、The method for observing the developmental stages of rice. The pre-heading day was defined by the collar distance between flag leaf and the first leaf below flag leaf (-1 leaf). The inter-collar length of -4 ± 1 、0 and 4 ± 1 cm were termed 15, 10 and 5 days before heading during winter (a-c), and 20, 15 and 10 days before heading on summer. The last leaf of rice was called flag leaf, the first leaf below flag leaf was called -1 leaf (d).



圖二、水稻上位葉葉鞘在抽穗期間的澱粉含量變化

(a) 從抽穗前 20 天到抽穗後 20 天，偵測澱粉含量在 -1 (●)、-2 (○)、-3 (■) 葉鞘中的變化 (採收時間點: 抽穗前 20、10、5 天以及抽穗後 0、5、15、20 天)。誤差值以 standard errors 表示 (n=3)。箭頭所指為抽穗當日。(b) -2 葉鞘組織中澱粉粒的分佈情形。利用碘染法觀察水稻葉鞘的澱粉粒分佈。

Figure 2、Changes of starch content in rice upper leaf sheaths during heading period. (a) The changes of starch content on -1 (●)、-2 (○) and -3 (■) leaf sheaths from 20-days before heading to 20-days after heading (sampling day: -20, -10, -5, 0, 5, 15, 20 days after heading). Standard errors (n=3) were indicated with vertical bars. Arrow indicates heading day. (b) The distribution of starch granules in -2 leaf sheath. The starch granules were detected by iodine staining. S: starch granule; MC: mesophyll cell; V: vascular tissue; FW: fresh weight.

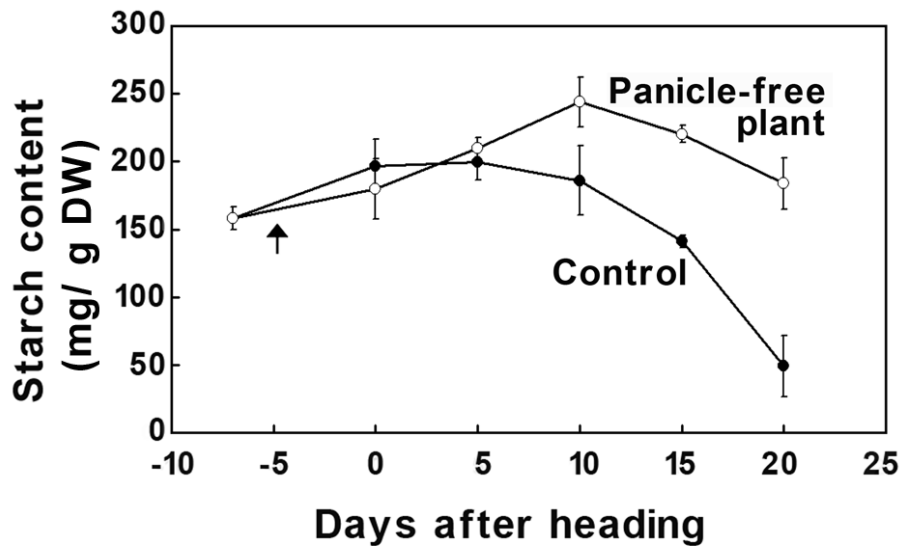


圖三、水稻抽穗期間-2葉葉鞘糖類含量變化

偵測-2葉葉鞘中澱粉含量(●)、蔗糖含量(○)及葡萄糖含量(■)在抽穗期間的變化(採收時間點:抽穗前9、6、3天以及抽穗後0、3、6及9天)。誤差值以 standard errors 表示 (n=3)。

Figure 3、The Changes of carbohydrate in -2 leaf sheath during heading period.

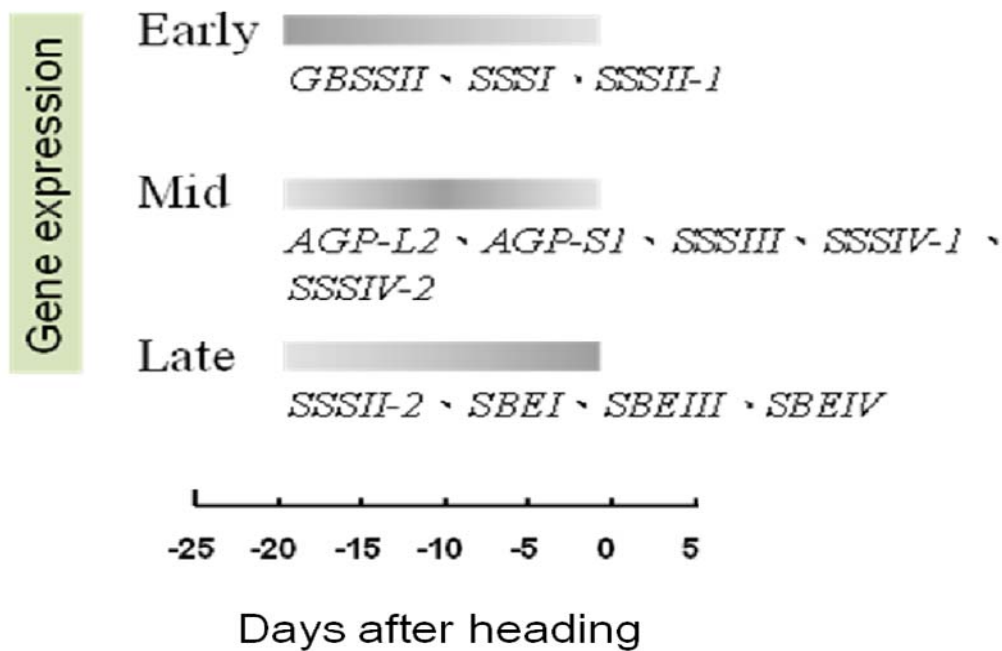
The contents of starch (●)、sucrose (○) and glucose (■) were detected in -2 leaf sheaths during heading period (sampling days: -9, -6, -3, 0, 3, 6, 9 days after heading). Standard errors (n=3) were indicated with vertical bars. DW: dry weight.



圖四、正常抽穗與去除幼穗之水稻植株其-2葉葉鞘澱粉變化趨勢

偵測抽穗期間-2葉葉鞘於對照組(●)及去除幼穗之水稻植株中(○)其澱粉含量變化(採收時間點: 抽穗前7天以及抽穗後0、5、10、15、20天)。誤差值以 standard errors 表示 (n=3)。箭頭所指的時間為從劍葉葉鞘中除去幼穗的時間點 (抽穗前5天)。

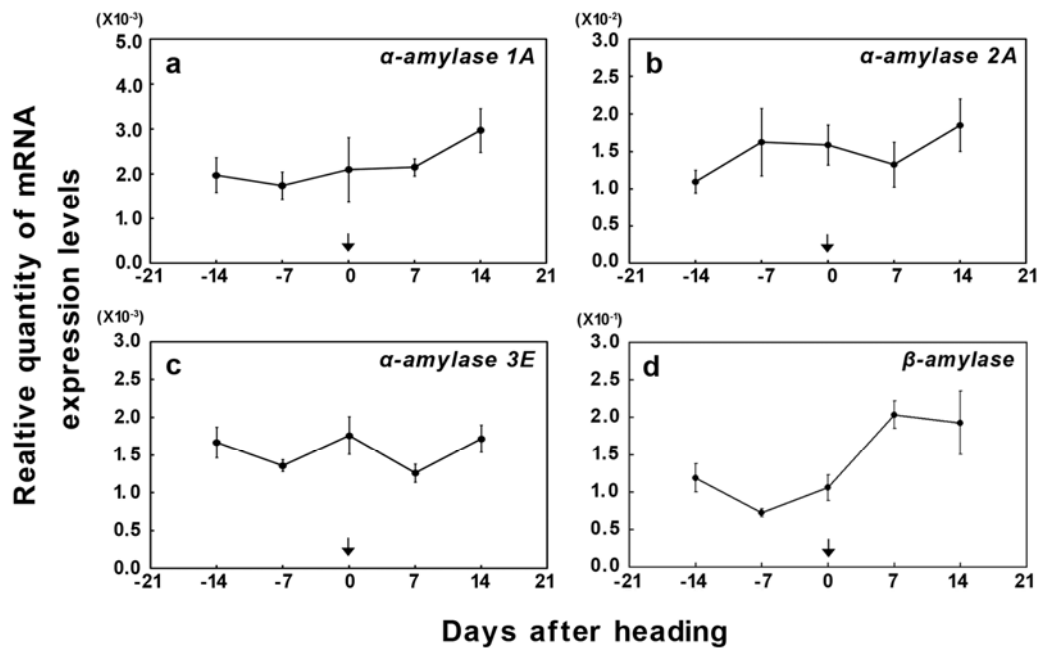
Figure 4、Changes of starch content patterns in -2 leaf sheath of rice with and without panicles. The starch content were detected in -2 leaf sheath of rice with (●) and without (○) panicles (sampling day : -7, 0, 5, 10, 15 and 20 days after heading). Standard errors (n=3) were indicated with vertical bars. The arrow indicates the day when removed young panicle from leaf sheath of flag leaf (5 days before heading).



圖五、澱粉代謝相關基因於抽穗前之表現趨勢

可依澱粉代謝相關基因其在抽穗前時期之變化趨勢分類成三群：(一) 早期表現基因(early stage)：此群基因於抽穗前 20 天左右即達最大表現量，接著下降，包含了 *GBSSII*、*SSSI* 與 *SSSII-1*。(二) 中期表現基因 (mid stage)：含有 *AGP-L2*、*AGP-S1*、*SSSIII*、*SSSIV-1* 與 *SSSIV-2* 等基因，他們於抽穗前 20 天僅具中度表現，之後隨時間開始上升，直到抽穗前 10 天達到高峰。(三) 晚期表現基因 (late stage)：這類基因在抽穗前 20 天至 10 天都呈現低表現，但於抽穗當日會大量表現，包含的基因有 *SSSII-2*、*SBEI*、*SBEIII* 及 *SBEIV*。矩形中深淺顏色分別表示基因表現之強弱。

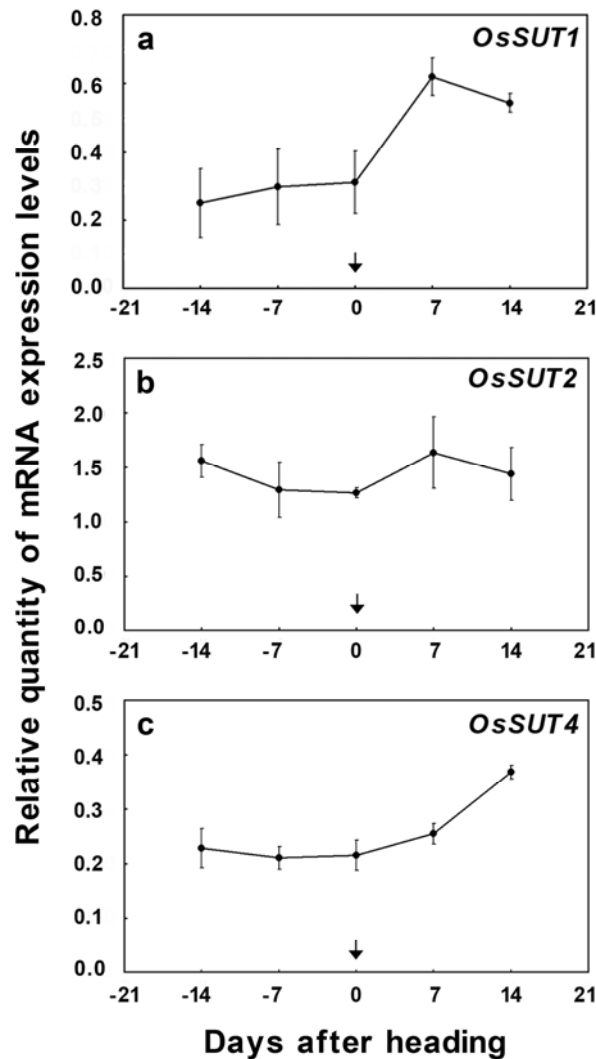
Figure 5、Expression levels of genes involved in starch synthesis at pre-heading stage. Three patterns in leaf sheaths were defined at pre-heading stage : (1) Early stage genes, which expressed high level at 20 days before heading (DBH) and followed by decline expressions. This group contained *GBSSII*、*SSSI* and *SSSII-1* ; (2) Mid stage group, included *AGP-L2*、*AGP-S1*、*SSSIII*、*SSSIV-1* and *SSSIV-2*. They had medium expression levels at 20 DBH, quickly rised a peak at 10 DBH ; (3) Late stage genes, which had low expression levels from 20 DBH to 10 DBH, followed by a rapidly increased at heading day. The group comprehended *SSSII-2*、*SBEI*、*SBEIII* and *SBEIV*. In rectangle, the color indicated the gene expression pattern.



圖六、葉鞘中澱粉分解相關基因於抽穗期間之表現

以 real-time RT-PCR 方式偵測-2 葉葉鞘中 *α-amylase 1A*、*2A*、*3E* 及 *β-amylase* 於抽穗期間之表現 (採收時間點: 抽穗前 14、7 天以及抽穗後 0、7、14 天)。誤差值以 standard errors 表示 (n=3)。箭頭所指為抽穗當日。

Figure 6、Expression levels of genes involved in starch degradation in leaf sheaths during heading period. The transcript profiles of *α-amylase 1A*、*2A*、*3E* and *β-amylase* were analyzed by real-time RT-PCR (sampling day: -14, -7, 0, 7, 14 days after heading). Standard errors (n=3) were indicated with vertical bars. The arrow indicates heading day.



圖七、葉鞘中 *OsSUTs* 基因於抽穗期間之表現

以 real-time RT-PCR 方式偵測-2 葉葉鞘中 *OsSUT1*、2 與 4 於抽穗期間之表現 (採收時間點: 抽穗前 14、7 天以及抽穗後 0、7、14 天)。誤差值以 standard errors 表示 (n=3)。箭頭所指為抽穗當日。

Figure 7、Expression levels of genes involved in sucrose transport in leaf sheaths during heading period. The transcript profiles of *OsSUT1*、2 and 4 were analyzed by real-time RT-PCR (sampling day : -14, -7, 0, 7, 14 days after heading). Standard errors (n=3) were indicated with vertical bars. The arrow indicates heading day.

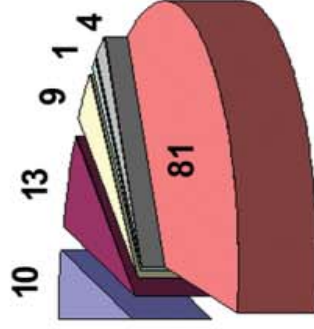
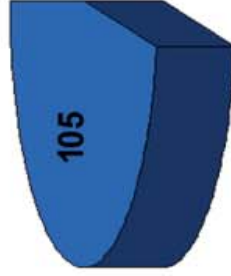
**Carbohydrate metabolism/
Glycosylated modification**

Examples:

- Beta-amylase
- UDP-glucose glucosyltransferase
- Sucrose synthase
- Endo-1,3-1,4-beta-D-glucanase
- Beta-D-glucan exohydrolase
- Xyloglucan endotransglycosylase-like protein
- Pyrophosphate-dependent-phosphofructokinase
- Beta-galactosidase
- Beta-glucosidase

Unknown

Unclassified



Molecule transport

Examples :

- Ammonium transporter^a
- Phosphate transporter
- Putative sorbitol transporter
- Zinc transporter
- Phospholipid transfer protein
- ABC transporter

Hormone synthesis

Examples :

- 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase

Developmental regulation

Example :

- Early proembryo mRNA
- Homeodomain leucine zipper protein
- Putative dormancy-associated protein
- Floral organ regulator 2

Signaling and transcriptional regulation

Examples :

- NPK1-related protein kinase-like protein
- EF-hand Ca²⁺-binding protein CCD1
- DNA-binding protein ABF2
- AP2-related transcription factor
- Putative B regulatory subunit of protein phosphatase 2A
- Plasma membrane Ca²⁺-ATPase
- Putative guanylate cyclase
- Abscisic acid- and stress-inducible protein

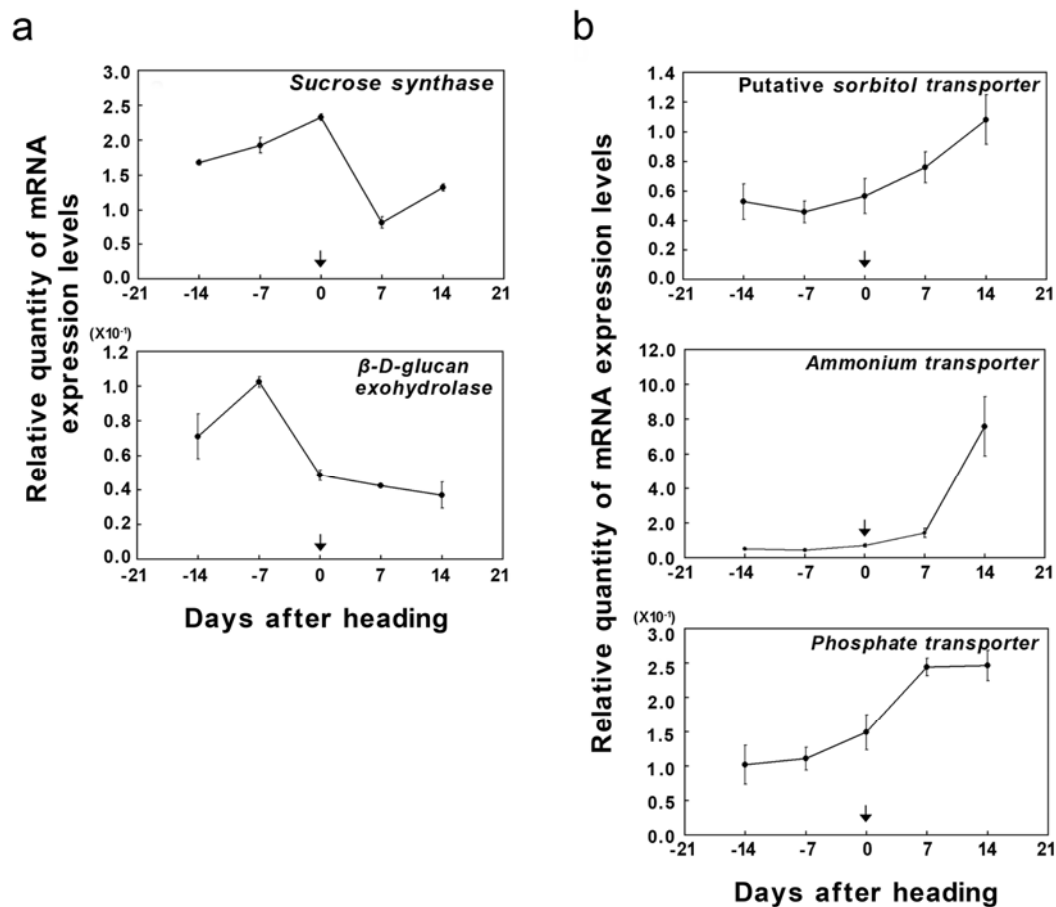
圖八、葉鞘於儲存及供源時期呈現差異性表現基因之分群與歸類

利用 whole-genome microarray 的方法，廣泛地挑選水稻葉鞘中於儲存期及供源期具有差異性表現之基因。總共有 223 個基因顯示在供源時期被促進或抑制表現三倍以上，將這些基因依照功能性可區分成數群，圖中顯示每一群之名稱及所包含的基因個數。圖中在醣類代謝 (carbohydrate metabolism)、醣基修飾 (glycosylated modification)、分子運輸 (molecule transport)、荷爾蒙合成 (hormone synthesis)、生長發育調控 (developmental regulation)、訊息調控 (signaling regulation) 與轉錄調控 (transcriptional regulation) 上所列出的基因，皆以 real-time RT-PCR 方法確認過其在葉鞘兩個時期之表現。於供源時期被促進表現之基因以紅色表示，而綠色表示其基因於供源時期之基因表現低於儲存期。

^a 此基因之表現於 microarray 及 real-time RT-PCR 結果中呈現不同反應，以 real-time RT-PCR 為最終結果。

Figure 8、Grouping of the rice genes differentially expressed at the sink and source leaf sheaths. To identify the genes differentially expressed in leaf sheaths at pre- and post-heading stage by microarray approach. Totally 223 genes showed at least 3-fold increased or repressed expressions in the source leaf sheaths compared to the sink leaf sheaths. These genes were classified according to putative function, and the number indicated the amount of genes involved in this group. The expression patterns of carbohydrate metabolism-, glycosylated modification-, molecule transport-, hormone synthesis-, developmental regulation-, signaling- and transcriptional regulation-related genes listed here all have been confirmed by real-time RT-PCR. Red color showed that the genes were up-regulated in source leaf sheaths, and green color indicated the genes were down-regulated at post-heading stages.

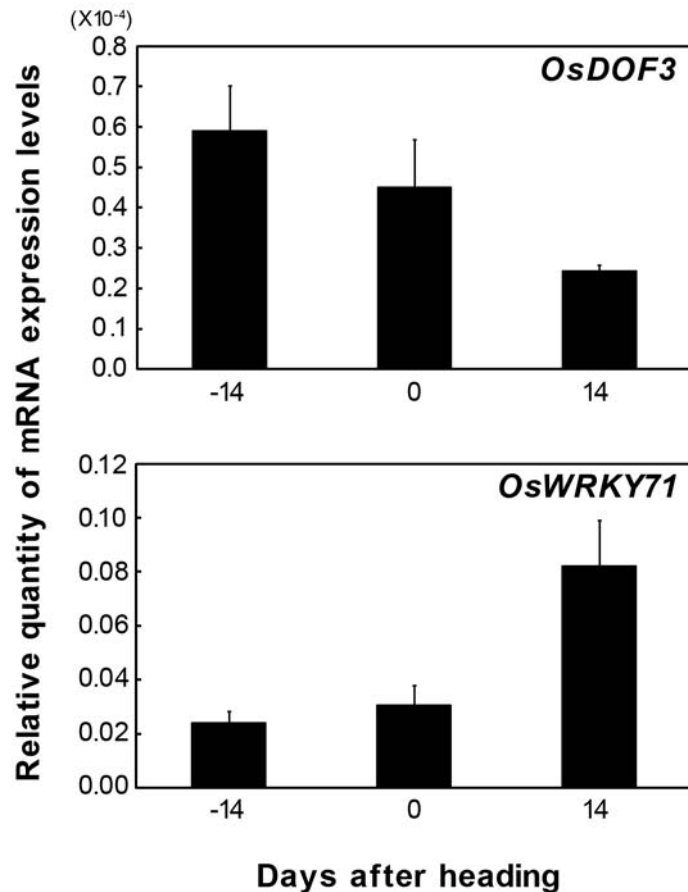
^a indicated the expression pattern of gene was corrected by real-time RT-PCR analysis.



圖九、葉鞘醣類代謝及分子轉運蛋白相關基因之表現

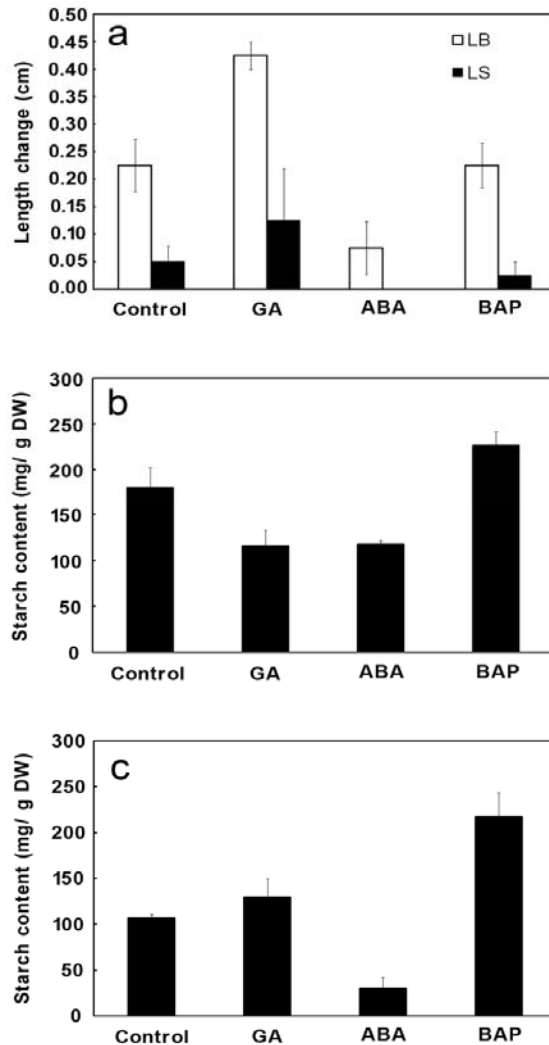
以 real-time RT-PCR 方式偵測水稻-2 葉鞘醣類代謝相關基因：*sucrose synthase* 及 β -D-glucan exohydrolase (a) 與分子轉運蛋白：*putative sorbitol transporter*、*ammonium transporter* 及 *phosphate transporter* (b) 於抽穗期間之表現 (樣品採收時間：抽穗前 14、7 天及抽穗後 0、7 及 14 天)。誤差值以 standard errors 表示 (n=3)。箭頭所指為抽穗當日。

Figure 9、Expression levels of carbohydrate metabolism- and molecule translocation-related genes in leaf sheaths during heading period. The transcript profiles of carbohydrate metabolism-related genes (*sucrose synthase* and β -D-glucan exohydrolase) (a) and molecule translocation-related genes (*putative sorbitol transporter*、*ammonium transporter* and *phosphate transporter*) (b) were analyzed by real-time RT-PCR analysis (sampling day : -14, -7, 0, 7, 14 days after heading). Standard errors (n=3) were indicated with vertical bars. The arrow indicates heading day.



圖十、葉鞘中荷爾蒙訊息傳導相關轉錄因子於抽穗期間之表現。收集抽穗前 14 天及抽穗後 0 及 14 天之水稻-2 葉葉鞘，以 real-time RT-PCR 方式偵測 *OsDOF3* 與 *OsWRKY71* 轉錄因子於抽穗期間之基因表現變化。(樣品採收時間：抽穗前 14、7 天及抽穗後 0、7 及 14 天)。誤差值以 standard errors 表示 (n=3)。箭頭所指為抽穗當日。

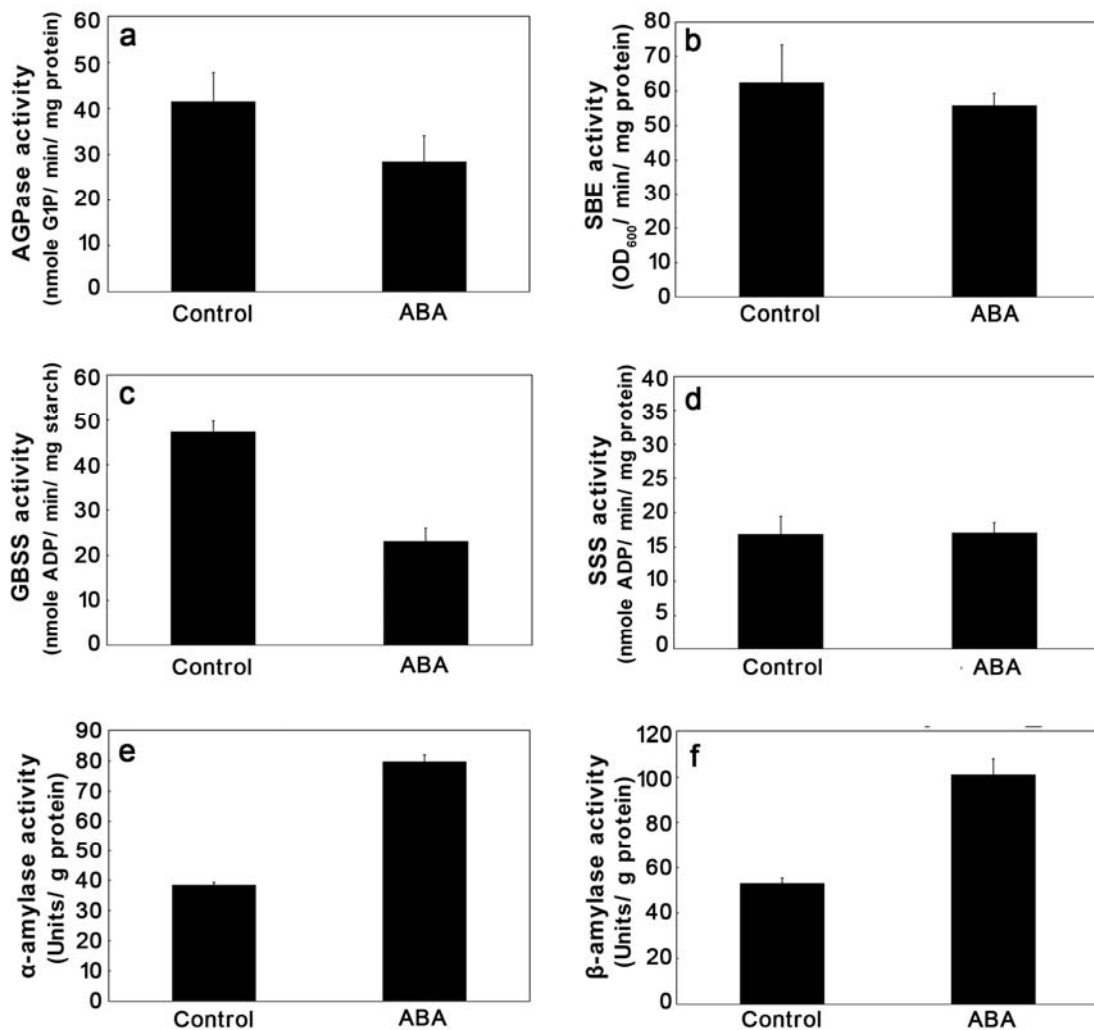
Figure 10、Expression levels of transcription factors involved in hormone signaling transduction in leaf sheaths during heading period. The transcript profiles of *OsDOF3* and *OsWRKY71* were analyzed by real-time RT-PCR analysis (sampling day : -14, -7, 0, 7, 14 days after heading). Standard errors (n=3) were indicated with vertical bars. The arrow indicates heading day.



圖十一、植物荷爾蒙對水稻葉鞘生長及其澱粉含量之影響

(a) 儲存期 (抽穗前 7-10 天) 葉鞘及葉身在 GA、ABA 與 BAP 荷爾蒙處理 24 小時下的長度變化。偵測儲存期 (抽穗前 7-10 天) (b) 與供源期 (抽穗後 7-10 天) (c) 葉鞘在 GA、ABA 與 BAP 荷爾蒙處理 24 小時下的澱粉含量。誤差值以 standard errors 表示 (n=3)。(□) LB : leaf blade ; (■) LS : leaf sheath ; DW : dry weight 。

Figure 11、The effects of hormone on the growth and starch content of rice leaf sheath. (a) Changes of length of sink stage leaf blade and leaf sheath (7-10 days before heading) under GA、ABA and BAP treatments for 24 h. The sink stage leaf sheath (7-10 days before heading) (b) and source stage leaf sheath (7-10 days after heading) (c) treated GA、ABA and BAP for 24 h were detected starch content. Standard errors (n=3) were indicated vertical bars. (□) LB : leaf blade ; (■) LS : leaf sheath ; DW : dry weight.



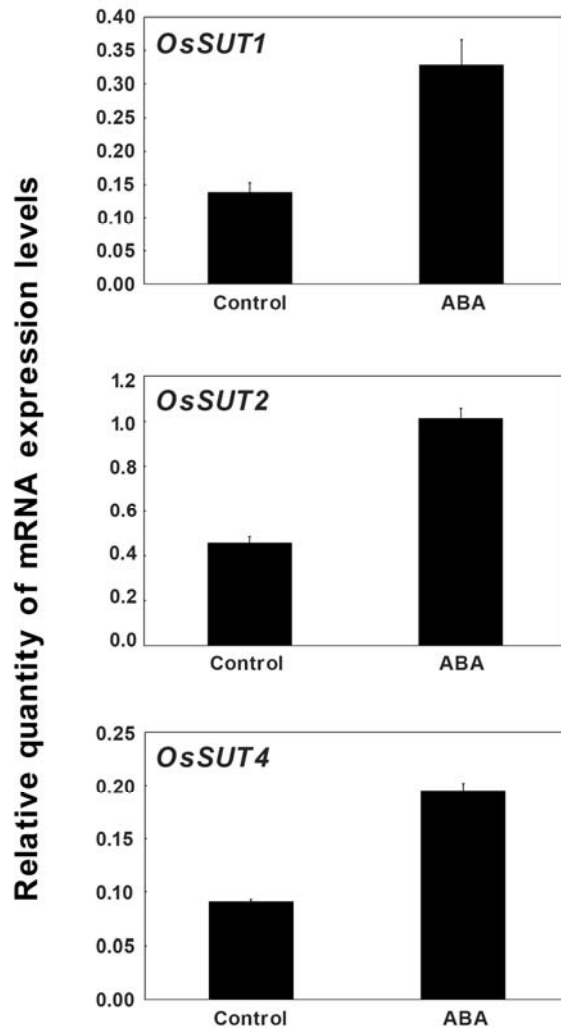
圖十二、植物荷爾蒙 ABA 對水稻葉鞘澱粉合成與分解相關酵素活性之影響

收集抽穗前 7-10 天的切離葉鞘，處理 ABA 荷爾蒙 24 小時，測定澱粉合成相關酵素: AGPase (a)、SBE (b)、GBSS (c)、SSS (d) 與澱粉分解相關酵素: α -amylase (e)、 β -amylase (f) 之活性。實驗(a)~(d)數據為 5 重複的平均結果，(e)、(f)為 3 重複的平均結果，誤差值以 standard errors 表示。(e) α -amylase 活性單位定義為在 α -glucosidase 過多的條件下，每分鐘由 PNPG7 釋放出 1 μ mole 的 *p*-nitrophenol 為一單位。(f) β -amylase 活性單位定義為在 α -glucosidase 過多的條件下，每分鐘由 PNPG5 釋放出 1 μ mole 的 *p*-nitrophenol 為一單位。

Figure 12、The effects of hormone on starch synthesis- and degradation-related enzyme activities in rice leaf sheath. The sink leaf sheath (7-10 days before heading) treated with ABA were analyzed starch metabolism enzyme activities. Changes in en-

zyme activities for AGPase (a), SBE (b), GBSS (c), SSS (d), α -amylase (e) and β -amylase (f) in leaf sheath. (a)~(d) Standard errors (n=5) were indicated vertical bars. (e) 、 (f) Standard errors (n=3) were indicated vertical bars. (e) One Unit of α -amylase activity is defined as the amount of enzyme, in the presence of excess α -glucosidase, required to release one micromole of *p*-nitrophenol from BPNPG7 in one minute under the defined assay conditions. (f) One Unit of β -amylase activity is defined as the amount of enzyme, in the presence of excess α -glucosidase, required to release one micromole of *p*-nitrophenol from PNPG5 in one minute under the defined assay conditions.

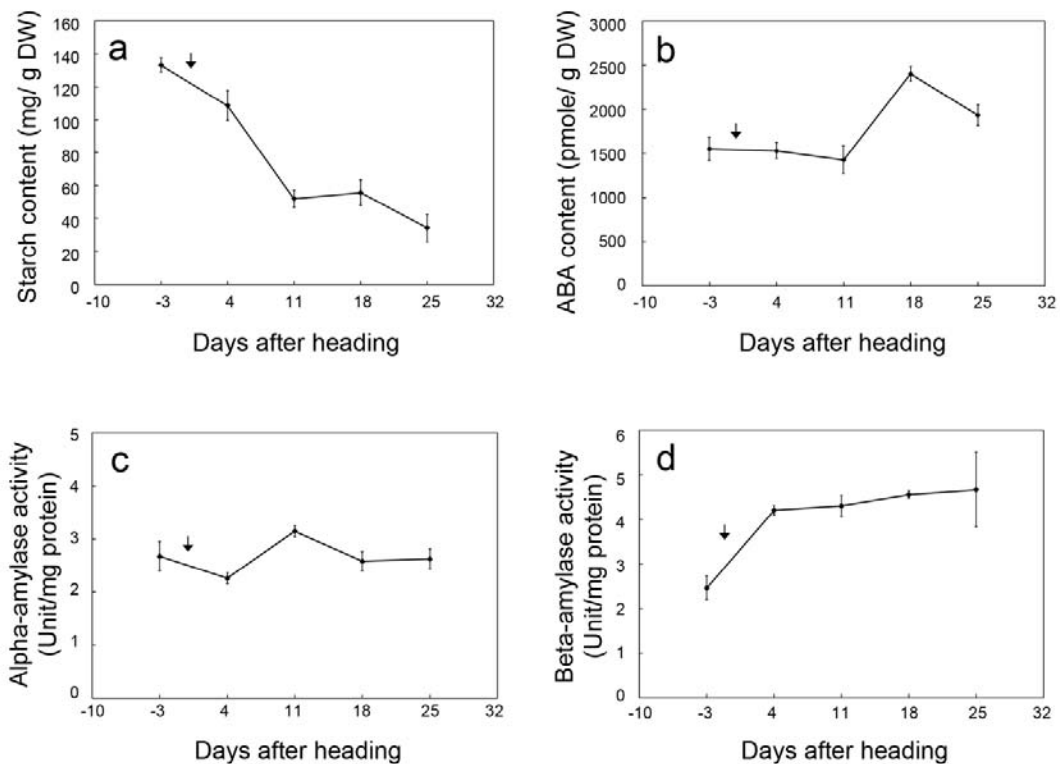




圖十三、植物荷爾蒙 ABA 對水稻葉鞘中 *OsSUTs* 基因表現之影響

收集抽穗前 7-10 天的切離葉鞘，處理 ABA 植物荷爾蒙 24 小時，測定水稻蔗糖轉運蛋白: *OsSUT1*、*OsSUT2* 及 *OsSUT4* 之基因相對表現量。誤差值以 standard errors 表示 (n=3)。

Figure 13、The effects of hormone on transcript levels of *OsSUTs* in leaf sheaths during heading period. The sink leaf sheath (7-10 days before heading) treated with ABA for 24 h were analyzed *OsSUTs* genes (*OsSUT1*、*OsSUT2* and *OsSUT4*) expressions. Standard errors (n=3) were indicated with vertical bars.



圖十四、葉鞘中 ABA 含量與澱粉分解酵素活性在抽穗期間的變化

測定葉鞘澱粉含量 (a)、ABA 含量 (b)、 α -amylase (c) 及 β -amylase 酵素活性 (d) 於抽穗期間之變化 (採收時間點：抽穗前 3 天以及抽穗後 4、11、18、25 天)。誤差值以 standard errors 表示 ($n=3$)。箭頭表示抽穗當日。

Figure 14、Changes of starch content, ABA content and starch degradation-related enzyme activities in leaf sheath during heading period. Detection of starch content (a), ABA content (b), and α -amylase (c), β -amylase (d) enzyme activities in leaf sheath during heading period (sampling day : -3, 4, 11, 18, and 25 days after heading). Standard errors ($n=3$) were indicated with vertical bars. The arrow indicates heading day.

-1968 **CCGAC**CGAATTGAATCGAGTCTCCAAAA**GAAAAA**AGAGAGAATGCCCTTCTCCTG**CATGC** -1909
 LTRECOREATCOR15 GT1CONSENSUS RYREPEATVFLEB4
 -1908 **ATG**CAGTCCCTGGTGCAGCAG**TGAC**CTCACTGAATTTGTTTGTCTTGGCTAGGGACTG -1849
 WRKY710S
 -1848 CTTGGAATT**GGATT**TTAGTCTAGCAAAAT**TTGACT**CCAACATGGGAG**CATGTG**AGATATA -1789
 ARR1AT WBOXATNPR1/WBOXHV1S01 MYCCONSENSUSAT
 /WRKY710S
 -1788 CATGTCATTGATCACATCACTATACTGCTGTGTATCTTTTCATACCACTACCATAATAT -1729
 -1728 GGTAGCCCAAGTAGT**GAAAT**TAAAGAAAGCACAACCTCCATATCTCGATCCATCTATCCC -1669
 GT1CONSENSUS
 -1668 TTATCACTATATATCTATATCA**TTATCC**CGTAGCTATTTTACAATATCACAAATATAT -1609
 SREATMSD
 -1608 AAAA**AGATT**TAGTTTTTTAAGGAGTGAATATGTTCTGTTTCAGT**TTGACT**ATAATTTCT -1549
 ARR1AT WBOXATNPR1/WBOXHV1S01
 /WRKY710S
 -1548 GAACTTTTTTTCAG**TGACCGAC**CAGGCGACCACCCGTTACTAAGATCAG**GGTAAA**ATGTGA -1489
 DRE2COREZMRAB17/LTRECOREATCOR15 GT1CONSENSUS
 /WRKY710S
 -1488 GG**CCGACGTG**TGTATTACTGGTCAATGGCAGAAGTAAATTC**GAAAT**GTATTGATGTAT -1429
 ABRELATERD1/ LTRECOREATCOR15 GT1CONSENSUS
 -1428 TATTCCTCTTTTTTTTTGTTCAAATTAAGA**TGAC**ACGTAGGCTCCAGCAACCAT**CCACGT** -1369
 WRKY710S ABREZMRAB28/ABRELATERD1
 /ABREATCONSENSUS/ABRERATCAL
 /ACGTABREMOTIFA20SEM/EMBP1TAEM
 /MYCCONSENSUSAT
 -1368 **GGC**GGCAGGTTGTGCACGTCCTCCATCTCCAACACATCAGCATTTCAGCAAAGAAA**GA** -1309
 GT1CONSENSUS
 -1308 **AAAA**ACTGTAGTGGACTTGCAGAAAACGC**TGACG**ACGAG**TACGT**ACGAATTAATGCCTT -1249
 ASF1MOTIFCAMV/WRKY710S ACGTABOX
 -1248 AAT**CATATG**ATATCTCAA**AGATT**AATTAATAAGTGGCTTGCCTAATTTTGTACTAATC -1189
 CATATGMSAUR/MYCCONSENSUSAT ARR1AT
 -1188 GCTATCTCGACGTAGCCAGAGAGC**CATGCATG**CATCACAGCGAGCCCACGGCCGACGAG -1129
 RYREPEATVFLEB4
 -1128 CACTCGCAACGAATTCGCTAGGCGTACACCGTGA**TGATT**TGATGCGT**TGATT**ACGGGT -1069
 ARR1AT ARR1AT
 -1068 ATTCATATTCCTTTATGAAAGGTTATTGTCAGACTTTTTTATTCCACAAGATCGATCAT -1009
 -1008 ACTACAAAGTTATTCTACAATAGTTTGAACAC**TTATCCAGTTG**TGTTAGAATATAATAA -949
 MYCCONSENSUSAT/SREATMSD
 /TATCCAOSAMY
 -948 TGATGGATGGATATGTATGCCATATTAACAATCTAAATTCCCCACAAAACATATAAAAG -889
 -888 AACACTATAATAAACTATGGT**TTATCC**ACATGGACATATATTTAAATGAAGTGGATCT -829
 SREATMSD/TATCCAOSAMY
 -828 CCGGTGCTCTTTACTGGTAGGATGAATGATGATAGA**GATAAA**AGCGTT**TAACAA**TATGG -769
 GT1CONSENSUS GAREAT/MYBGAHV
 -768 CCTCAGCGAATTCGTTATATTAATTAATCAATGAAAACATTTACT**GGATT**AATAAACT -709
 ARR1AT
 -708 CCATGCTACTCCATTATAAATGAACGCACACCTATATATAGCAAAATTCCTATTTGCCAG -649
 -648 TAGGTCCAATACTTCGGATCTGTTTTTTTTCTTTTAA**TATCCA**AAAT**TGATT**TTGGATA -589
 TATCCAOSAMY ARR1AT
 -588 ACTACTCGACAGTACAAACGAATT**AAACCA**GCTATTACAACGTCGAGT**GGATT**TAAACA -529
 MYB1AT ARR1AT

```

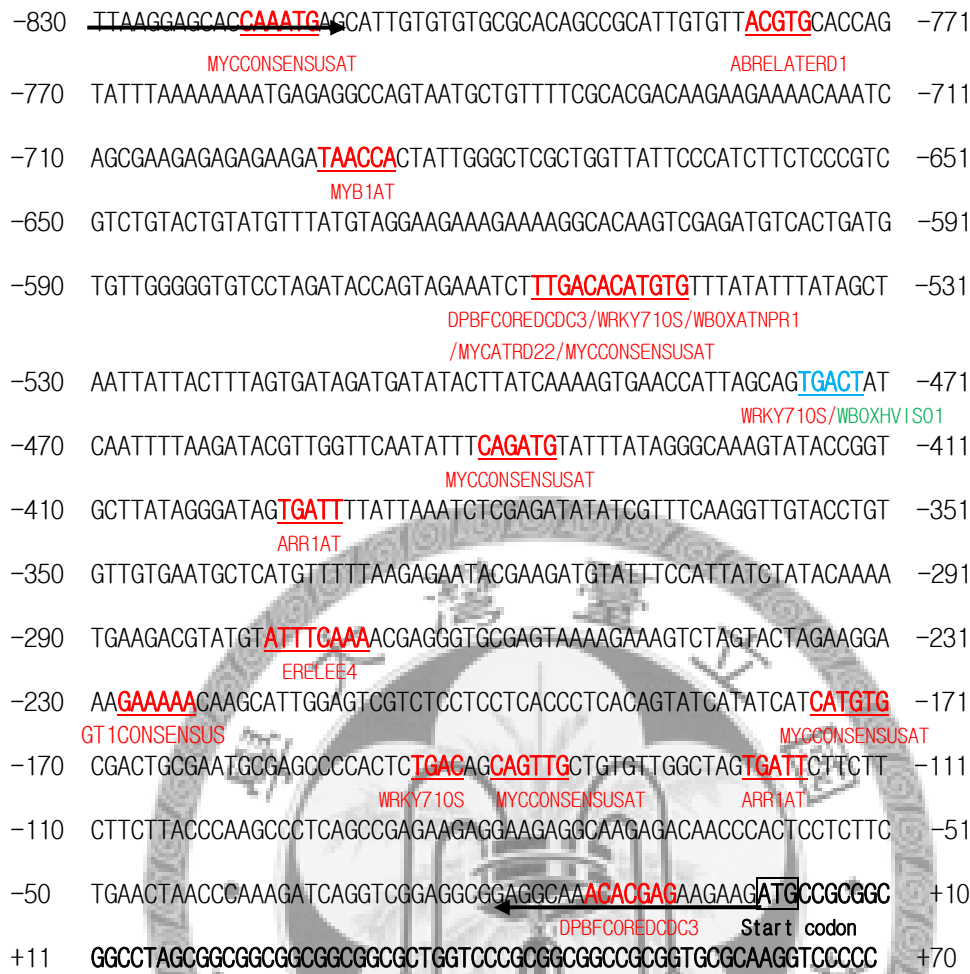
-528  CTCCTCTATTAATTACCTACAGAAAGTCGTTCCCGCTGAAATAATCGCACCGTCTAGA  -469
-468  AGCTCGGCAAGCGTGTGCTAATCCGATACTAACTCCATTAATCCATTTTCATTTCAAT  -409
-408  AATTGTTGAAGTTATTACTGCACTGGAATATAAAGGCAGGGGGGTAACTGGGTGTG  -349
                                GT1CONSENSUS  MYB2CONSENSUSAT
-348  TACAAAGTGTGGTGAGCATAGCAGTTGCAGGTGCACCACCCTTTATTATATTCCTCCT  -289
                                MYC2CONSENSUSAT  MYC2CONSENSUSAT
-288  TTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT  -229
-228  AAATGCTTCGCCTCTCTCGCTCGTCTCTCCAACACAAACCCACCACCTCCTCCTCTCC  -169
-168  TCCCATCCAGCACGGCCTCTCTCGCGGGCTTCCATTTCCATCTCCCCCTCCTCC  -109
                                ABRECE3ZMRAB28/ABRERATCAL
-108  TCCTACGTCTCCGCGCTCCTCACTTCTCCACTCGATTTCCTTTCTTGGCCTCCTCC  -49
                                ABR1AT
-48   TCTGACACAGGGGTGTGCAGGTTTGTGTTTGTGCGTGGCGCGTCCGCCATGCTCGCGGC  +12
                                DPBFCOREDCDC3/WRKY710S  Start codon
+13  AGCGGGCCGGAGGAGGCGGCGGCGGTGGTGGCGGGGGCTGGAGCTGTCGGTCGGGGTCG  +72

```

圖十五、*OsSUT1* 基因啟動子序列

利用 genomic-PCR 擴增 TNG67 水稻之 *OsSUT1* 基因啟動子 (PSUT1)，箭頭所指為所擴增之範圍(-1968~-10)，總長為 1959 bp。紅色與綠色標記分別代表與荷爾蒙及醣類調控相關的 *cis*-acting elements 位置，而藍色代表同時參與荷爾蒙及醣類調控的 *cis*-acting elements。

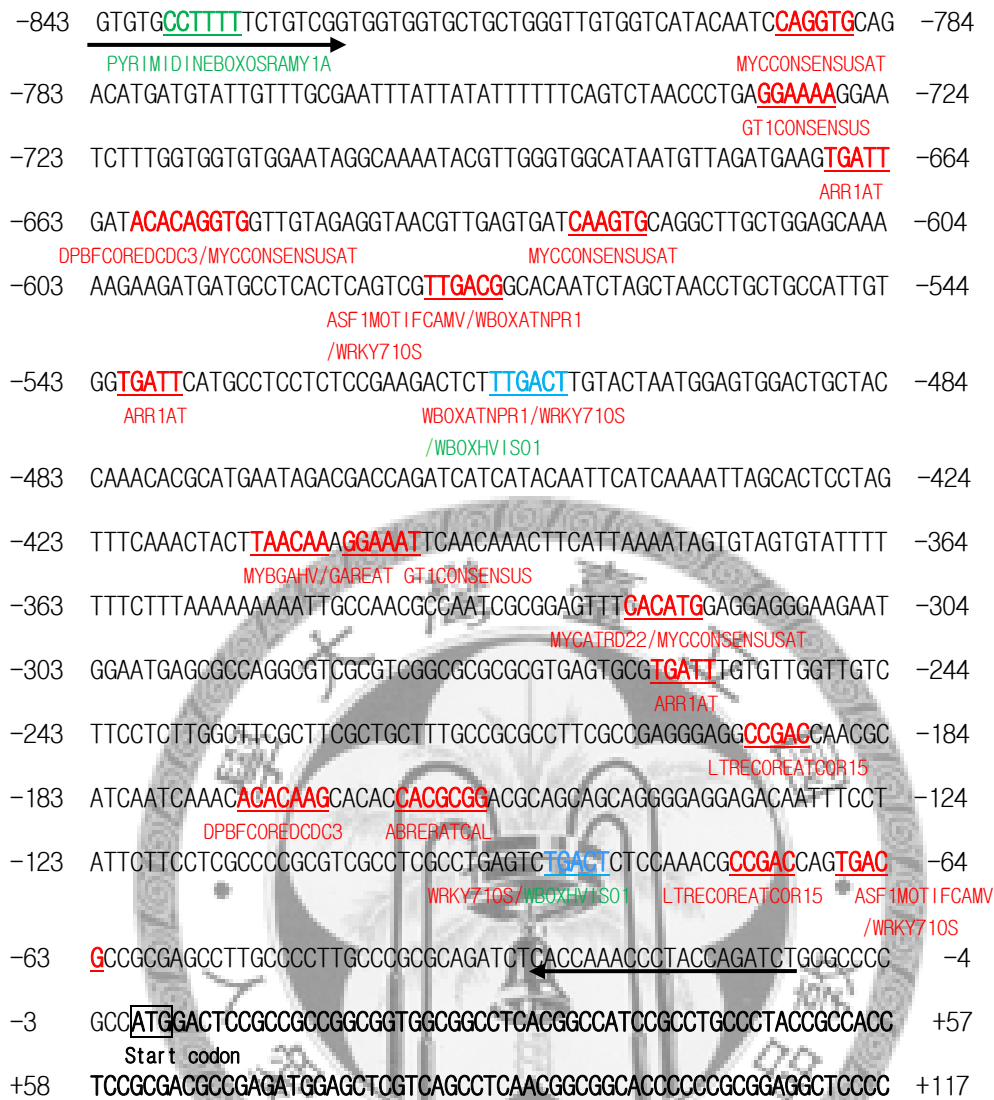
Figure 15 · *OsSUT1* promoter. *OsSUT1* promoter (PSUT1) was amplified from TNG67 by genomic PCR. The 1959 bp amplicon range was indicated by arrows (-1968~-10). Red and green colors showed that the hormone- and carbohydrate-responsive *cis*-acting elements, respectively, and blue color indicated both.



圖十六、*OsSUT2* 基因啟動子序列

利用 genomic-PCR 擴增 TNG67 水稻之 *OsSUT2* 基因啟動子(PSUT2)，箭頭所指為所擴增之範圍(-830~-1)，總長共 830 bp。紅色與綠色標記分別代表與荷爾蒙及醣類調控相關的 *cis*-acting elements 位置，而藍色代表同時參與荷爾蒙及醣類調控的 *cis*-acting elements。

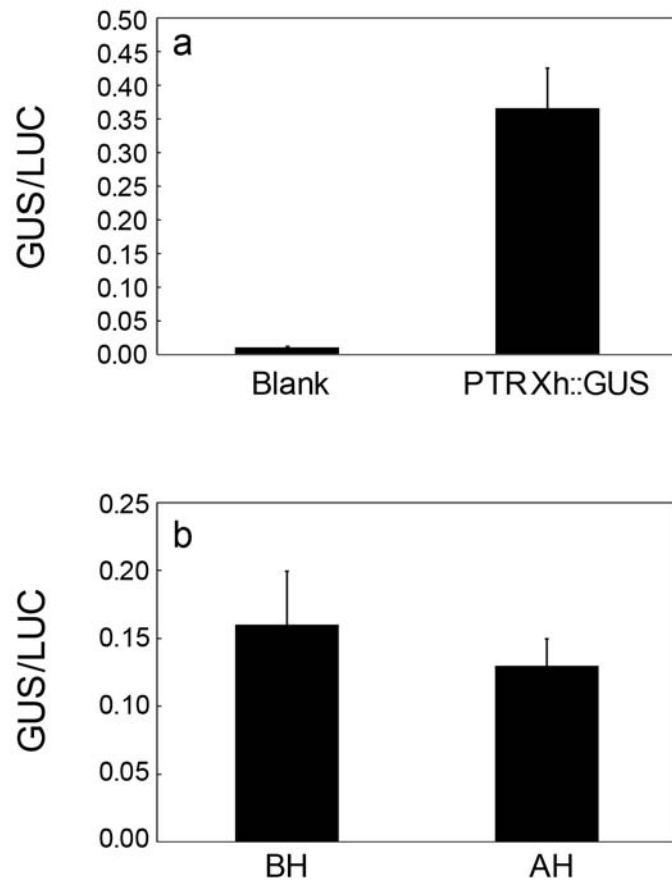
Figure 16. *OsSUT2* promoter. *OsSUT2* promoter (PSUT2) was amplified from TNG67 by genomic PCR. The 830 bp amplicon range was indicated by arrows (-830~-1). Red and green colors showed that the hormone- and carbohydrate-responsive *cis*-acting elements, respectively, and blue color indicated both.



圖十七、*OsSUT4* 基因啟動子序列

利用 genomic-PCR 合成 TNG67 水稻之 *OsSUT4* 基因啟動子(PSUT4)，箭頭所指為所擴增之範圍(-843~-11)，總長為 834 bp。紅色與綠色標記分別代表與荷爾蒙及醣類調控相關的 *cis*-acting elements 位置，而藍色代表同時參與荷爾蒙及醣類調控的 *cis*-acting elements。

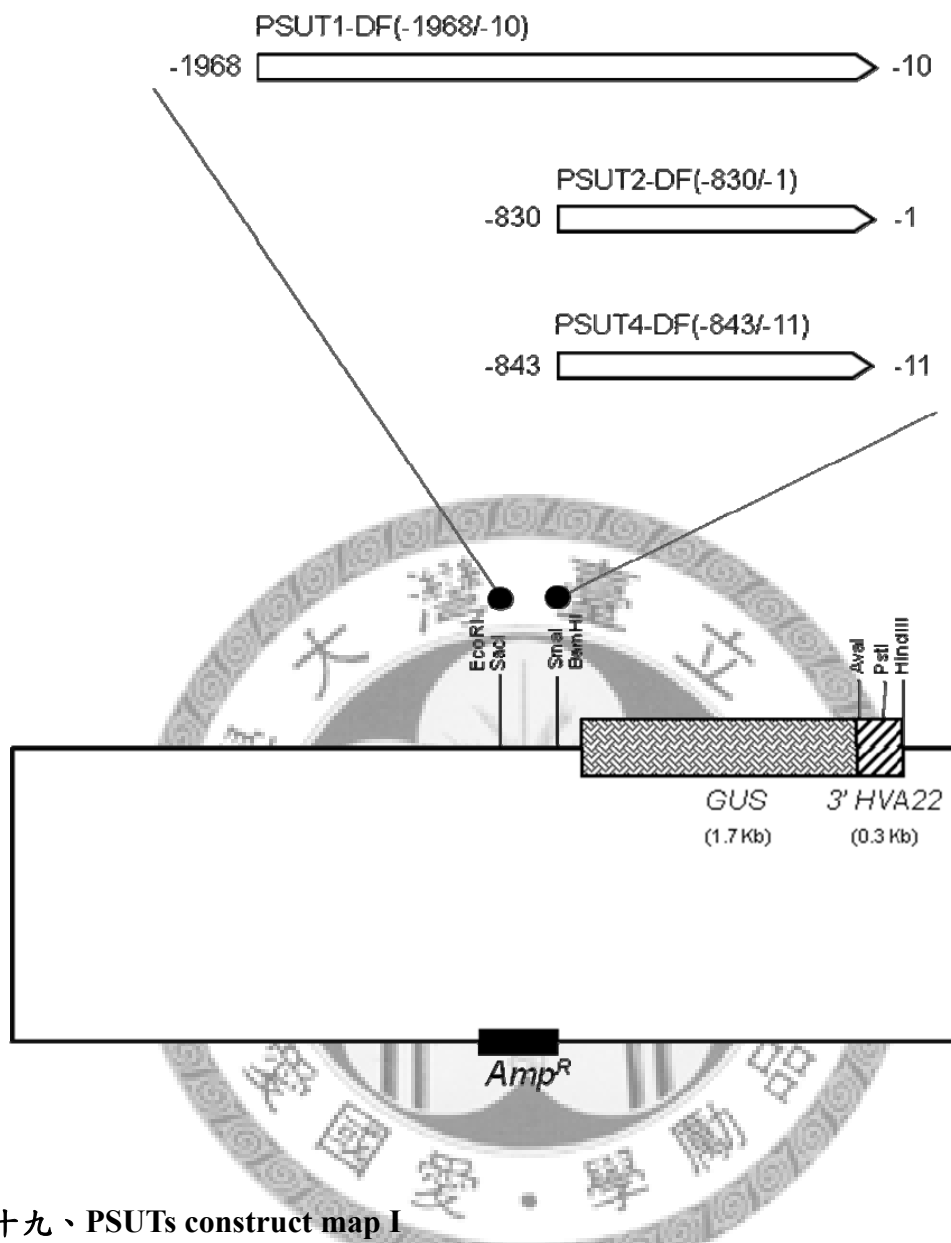
Figure 17. *OsSUT4* promoter. *OsSUT4* promoter (PSUT4) was amplified from TNG67 by genomic PCR. The 833 bp amplicon range was indicated by arrows (-833~-11). Red and green colors showed that the hormone- and carbohydrate-responsive *cis*-acting elements, respectively, and blue color indicated both.



圖十八、*TRXh* 與 *Ubi* 啟動子之暫時性表現

(a) 分析 *TRXh* 啟動子 (PTRXh) 於葉鞘中的表現，blank 為 P*Ubi*::luciferase (P*Ubi*::LUC) 暫時性表現之葉鞘。誤差值以 standard errors 表示 (n=4)。 (b) P*Ubi*::GUS 於儲存型葉鞘 (BH) 與供源型葉鞘 (AH) 中的暫時性表現分析。誤差值以 standard errors 表示 (n=3)。BH：before heading；AH：after heading。GUS/LUC：GUS 基因強度與 LUC 基因強度之比值。

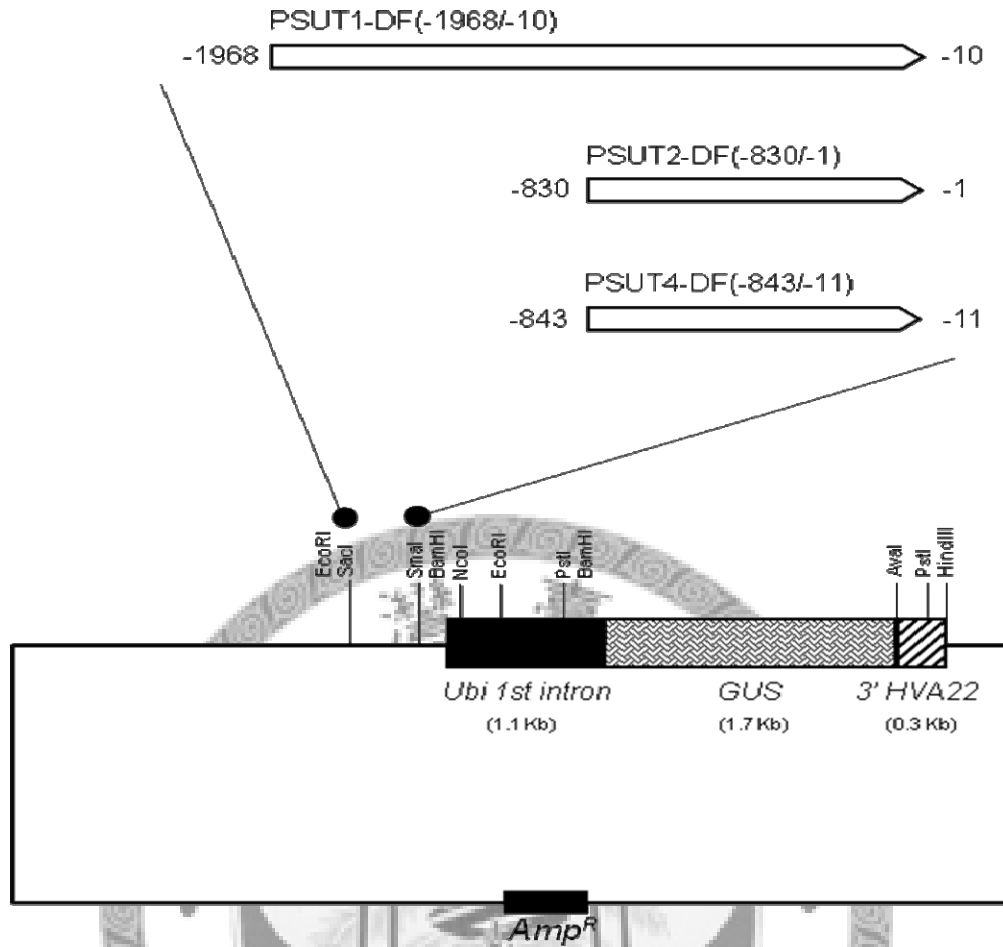
Figure 18、Transient expression of *TRXh* and *Ubi* promoters. (a) Activity analysis of *TPXh* promoter in leaf sheath. The P*Ubi*::luciferase plasmid serves as blank. Standard errors (n=4) were indicated with vertical bars. (b) Activity analysis of *Ubi* promoter in sink leaf sheath and source leaf sheath. Standard errors (n=3) were indicated with vertical bars. BH：before heading；AH：after heading. GUS/LUC：the ration of GUS activities to LUC activities.



圖十九、PSUTs construct map I

PSUT1 (1959 bp)、PSUT2 (830 bp) 與 PSUT4 (833 bp) 三個啟動子以 *SacI* 及 *SmaI* 切位接入 *GUS* 基因之前，形成 PSUTs::*GUS* 載體，其中包含 *GUS* 基因 (1.7 kb) 及 *HVA22* 的 3' 端 terminator (0.3 kb)。

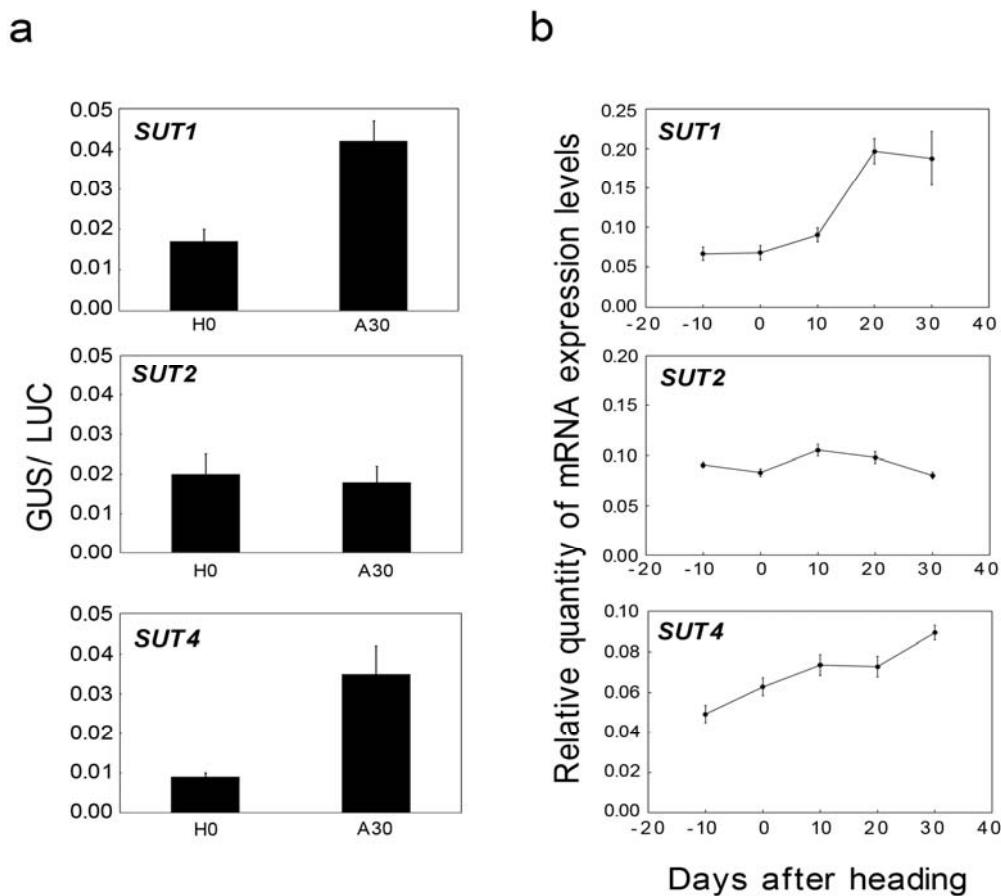
Figure 19、PSUTs construct map I. The PSUT1 (1959 bp), PSUT2 (830 bp) and PSUT4 (833 bp) were amplified by genomic PCR and cloned into *SacI*-*SmaI* digested *GUS* vector to generate the PSUTs::*GUS* plasmids. *GUS* vector contains *GUS* reporter gene, and 3' terminator of *HVA22* (0.3 kb).



圖二十、PSUTs construct map II

PSUT1 (1959 bp)、PSUT2 (830 bp) 與 PSUT4 (833 bp) 三個啟動子以 *SacI* 及 *SmaI* 切位接到 intron 之前，形成 PSUTs::Ubint::GUS 載體，其中包含 *ubiquitin* intron 1 (1.1 kb)、*GUS* 基因 (1.7 kb) 及 *HVA22* 的 3' 端 terminator (0.3 kb)。

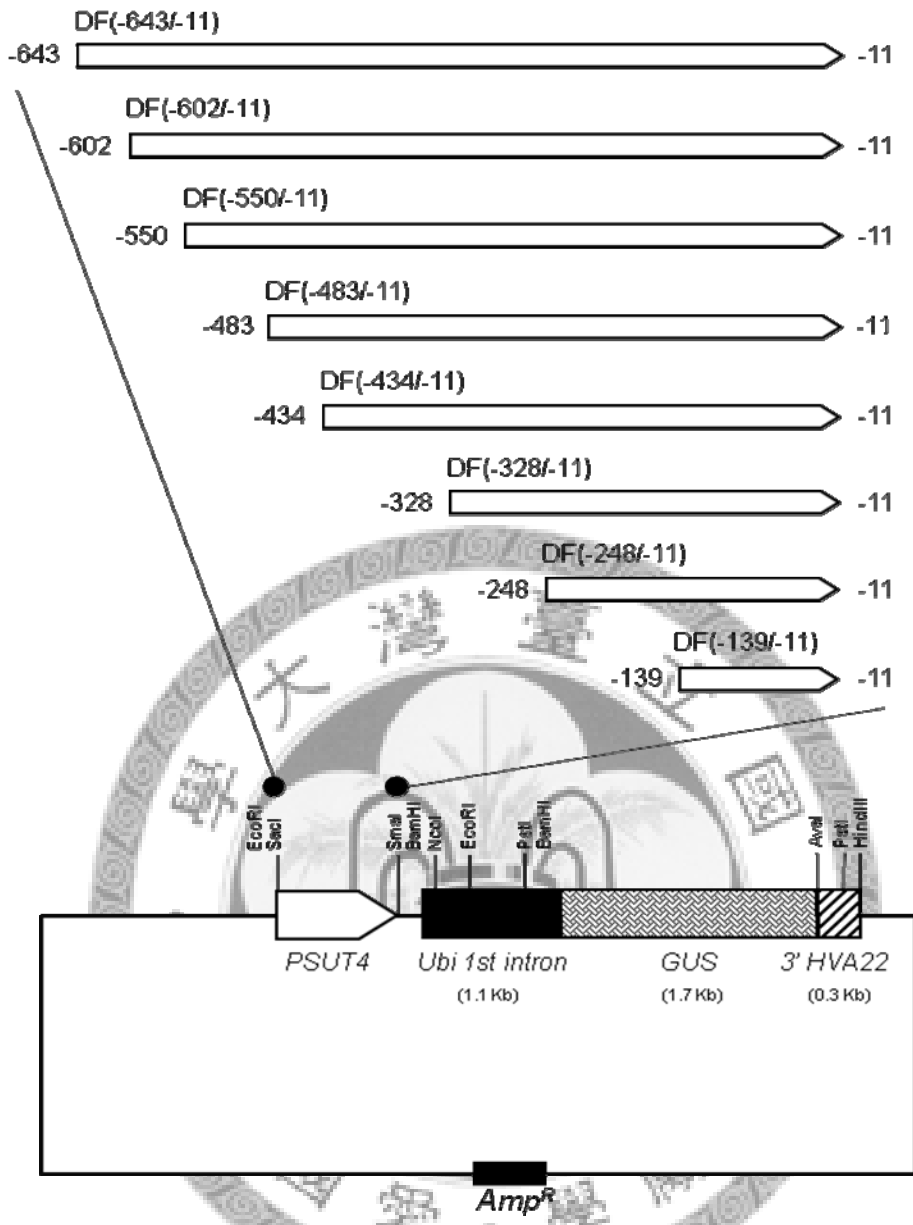
Figure 20、PSUTs construct map II. The PSUT1 (1959 bp), PSUT2 (830 bp) and PSUT4 (833 bp) were amplified by genomic PCR and cloned into *SacI-SmaI* digested Ubint::GUS vector to generate the PSUTs::Ubint::GUS plasmids. Ubint::GUS vector contains *ubiquitin* intron 1 (1.1 kb)、*GUS* reporter gene, and 3' terminator of *HVA22* (0.3 kb).



圖二十一、PSUT1、2 及 4 於葉鞘中的暫時性表現分析

收集抽穗當天與抽穗後 30 天之水稻-2 葉葉鞘，使用基因槍進行 *OsSUT1*、2、4 啟動子暫時性活性分析。(b) 採收抽穗前 10 天至抽穗後 30 天水稻-2 葉葉鞘，每隔 10 天採收一次，測定 *OsSUT1*、2 及 4 基因表現變化。誤差值以 standard errors 表示 (n=3)。H0：表示抽穗當天；A30：表示抽穗後 30 天。GUS/LUC：GUS 基因強度與 LUC 基因強度之比值。

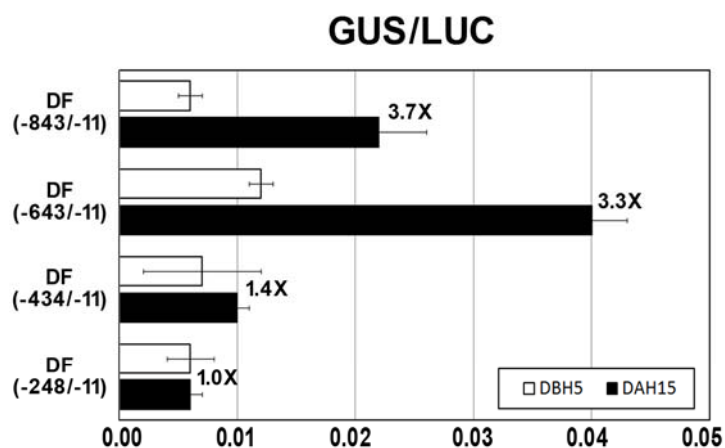
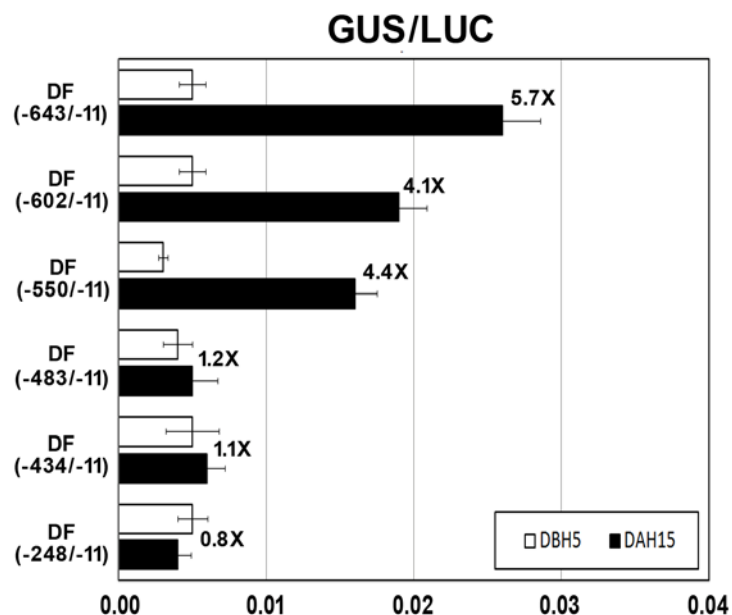
Figure 21、Transient expression of *OsSUTs* promoters. (a) Transient expression analysis of *OsSUTs* promoters in sink leaf sheaths (0 day after heading) and source leaf sheaths (30 day after heading). (b) Expression levels of *OsSUT1*, 2 and 4 in -2 leaf sheath during heading period (sampling day : -10, 0, 10, 20, 30 days after heading). The PUBi::luciferase plasmid serves as blank. Standard errors (n=3) were indicated with vertical bars. H0 : 0 day after heading (heading day) ; A30 : 30 day after heading. GUS/LUC : the ration of *GUS* activities to LUC activities.



圖二十二、*OsSUT4* 基因 5'端 deletion 啟動子片段之載體

OsSUT4 基因 5'端 deletion 啟動子片段以 *SacI* 及 *SmaI* 切位接進 *Ubint::GUS* 載體，其中包含 *ubiquitin* intron 1 (1.1 kb)、*GUS* 基因 (1.7 kb) 及 *HVA22* 的 3' 端 terminator (0.3 kb)。

Figure 22、*OsSUT4* 5' deletion promoter construct map. *OsSUT4* 5' deletion promoter fragments were amplified by PCR and cloned into *SacI-SmaI* digested *Ubint::GUS* vectors. *Ubint::GUS* vector contains *ubiquitin* intron 1 (1.1 kb)、*GUS* reporter gene, and 3' terminator of *HVA22* (0.3 kb).

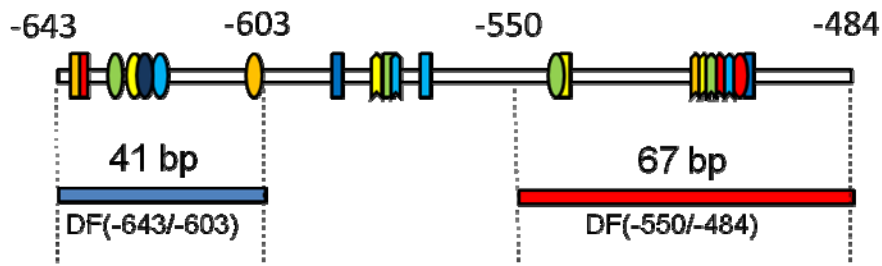
a**b**

圖二十三、*OsSUT4* 啟動子 5'-deletion 片段活性分析

收集抽穗前 5 天與抽穗後 15 天的水稻葉鞘，使用基因槍進行 PSUT4-DF (-843/-11)、PSUT4-DF(-643/-11)、PSUT4-DF(-434/-11) 及 PSUT4-DF(-248/-11) 之 GUS 活性分析。(b) 收集抽穗前 5 天與抽穗後 15 天的水稻葉鞘，利用基因槍進行 PSUT4-DF(-643/-11)、PSUT4-DF(-602/-11)、PSUT4-DF(-550/-11)、PSUT4-DF(-483/-11)、PSUT4-DF(-434/-11)及 PSUT4-DF(-248/-11)之啟動子活性分析。誤差值以 standard errors 表示 (n=3)。DBH5：5 days before heading；DAH15：15 days after heading。GUS/LUC：*GUS* 基因強度與 *LUC* 基因強度之比值。

Figure 23、**Transient expressions of *OsSUT4* 5'-deletion promoter fragments.** (a) Deletion analysis of PSUT4-DF (-843/-11)、PSUT4-DF(-643/-11)、PSUT4-DF(-434/-11) and PSUT4-DF(-248/-11) promoter fragments by bombardment in sink (5 day before heading) and source (15 day after heading) leaf sheaths. (b) Deletion analysis of PSUT4-DF(-643/-11) 、 PSUT4-DF(-602/-11) 、 PSUT4-DF(-550/-11) 、 PSUT4-DF(-483/-11) 、 PSUT4-DF(-434/-11) and PSUT4-DF(-248/-11) promoter fragments in sink (5 days before heading) and source (15 days after heading) leaf sheaths. Standard errors (n=3) were indicated with vertical bars. DBH5 : 5 days before heading; DAH15: 15 days after heading. GUS/LUC: the ration of *GUS* activities to LUC activities.





- | | | |
|------------------------|----------------------|--------------------------------|
| ACGTATERD1*(-639) | CURECORECR*(-506) | NODCON2GM/OSE2ROOTNODULE(-517) |
| ACGTTBOX*(-640) | DOFCOREZM(-604) | WBBOXPCWRKY1*(-514) |
| ARR1AT(-541) | EBOXBNNAPA(-627) | WROXATNPR1*(-578/-513) |
| ASF1MOTIFCAMV(-577) | GTGANTG10(-632/-542) | WBOXHVIS01/WBOXNTERF3(-132) |
| CAATBOX1(-569) | INTRONLOWER*(-623) | WRKY71OS(-577/-512) |
| CACTFTPPCA1(-588/-505) | MYCCONSENSUSAT(-627) | |

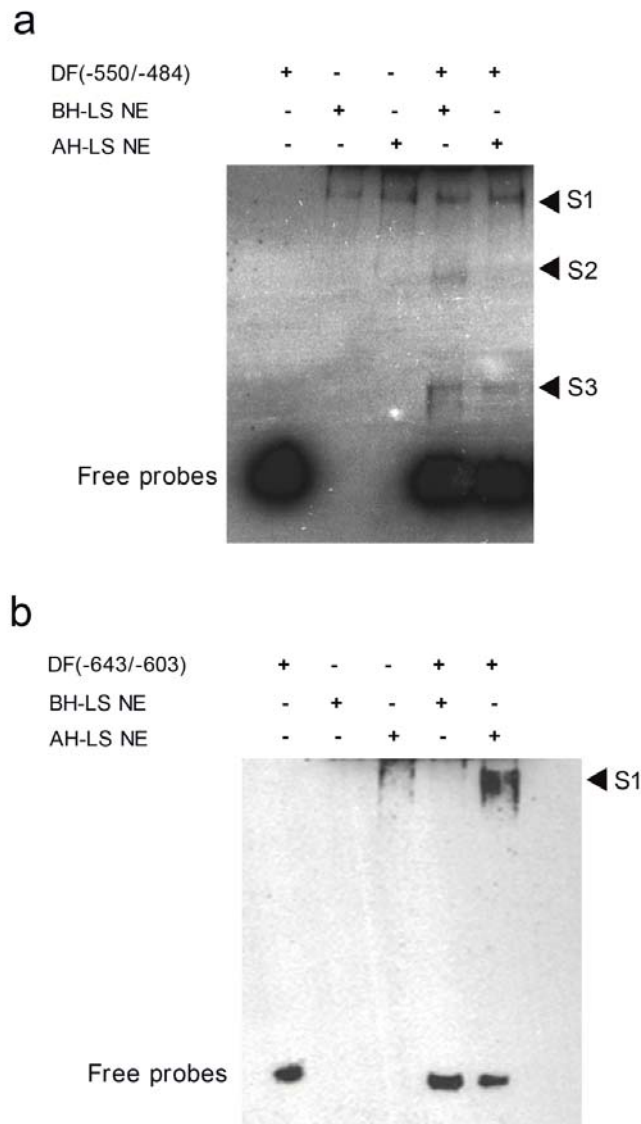
圖二十四、EMSA 所用 DNA 探針位置

DF(-550/-484) 探針位在 *OsSUT4* 啟動子-550~-484 之位置，共有 67 bp，而 DF(-643/-603) 位於-643~-603 的區域，具有 41 bp。

*表示僅出現於啟動子-484 上游區域之 *cis*-acting elements。

Figure 24、The position of EMSA DNA probes. The range of DF(-550/-484) DNA probe is from -550 to -484, and DF(-643/-603) DNA probe is from -643 to -603 on *OsSUT4* promoter.

* indicated the *cis*-acting elements were located at up-stream of -484 on *OsSUT4* promoter.

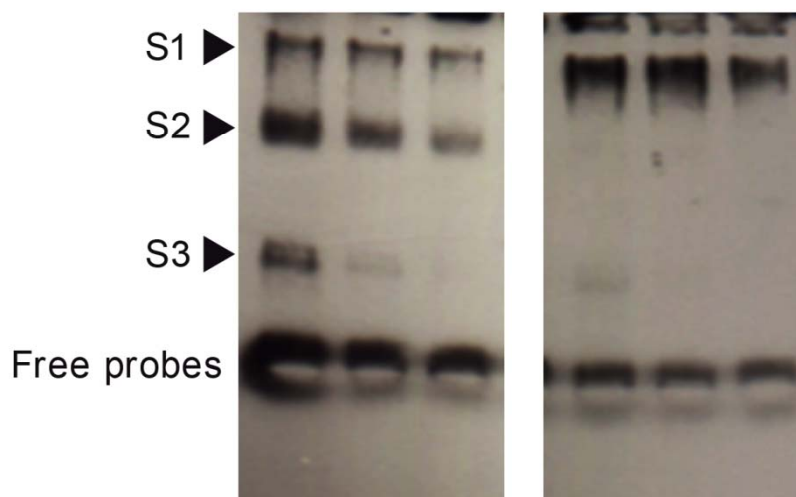


圖二十五、*OsSUT4* 啟動子片段與葉鞘核蛋白之結合分析

利用 EMSA 技術探討 *OsSUT4* 啟動子片段與葉鞘細胞核蛋白之結合能力，分別使用 DF(-550/-484) 探針 (a)與 DF(-643/-603) (b)進行實驗。BH-LS NE : before heading leaf sheath nuclear extract ; AH-LS NE : after heading leaf sheath nuclear extract ; S : shift band 。

Figure 25 、 Binding activities analysis of *OsSUT4* promoter fragments and leaf sheaths nuclear extracts. DF(-550/-484) DNA probe (a) and DF(-643/-603) (b) DNA probe were used to analyze the binding activity with nuclear extract of leaf sheaths. BH-LS NE : before heading leaf sheath nuclear extract ; AH-LS NE : after heading leaf sheath nuclear extract ; S : shift band.

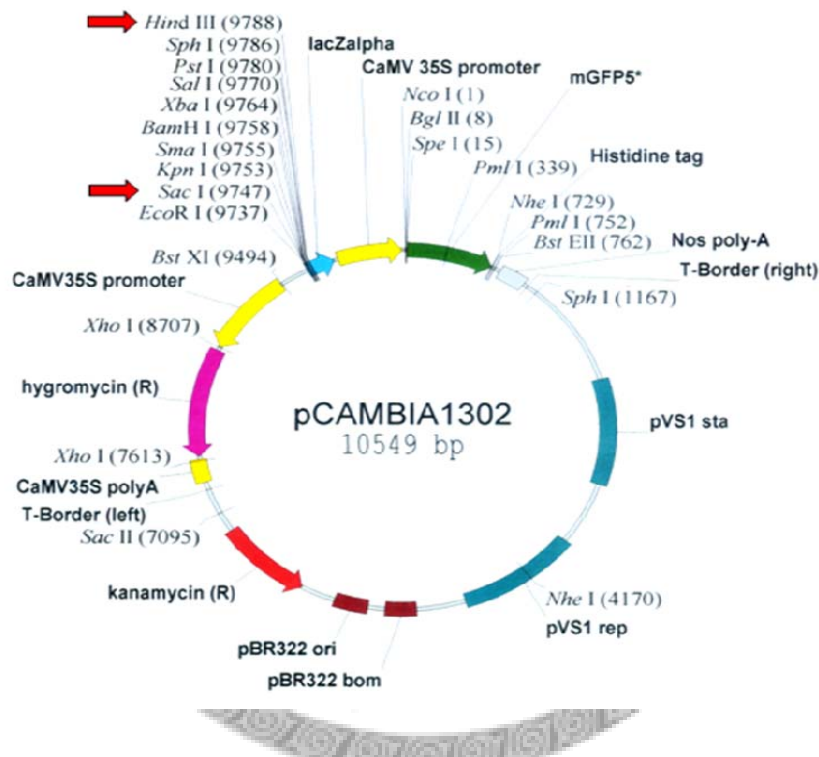
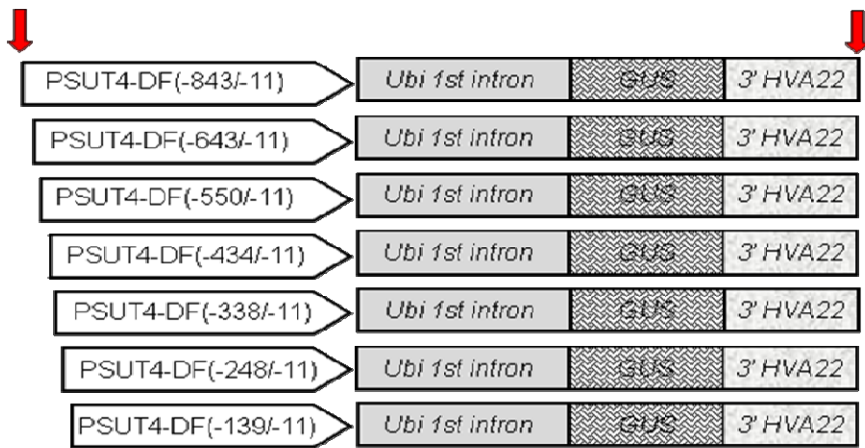
Labeled DF(-550/-484)	+	+	+	+	+	+
Unlabeled DF(-550/-484)	0	0.5X	1X	0	0.5X	1X
BH-LS NE	+	+	+	-	-	-
AH-LS NE	-	-	-	+	+	+



圖二十六、*OsSUT4* 啟動子片段與葉鞘核蛋白之競爭型結合分析

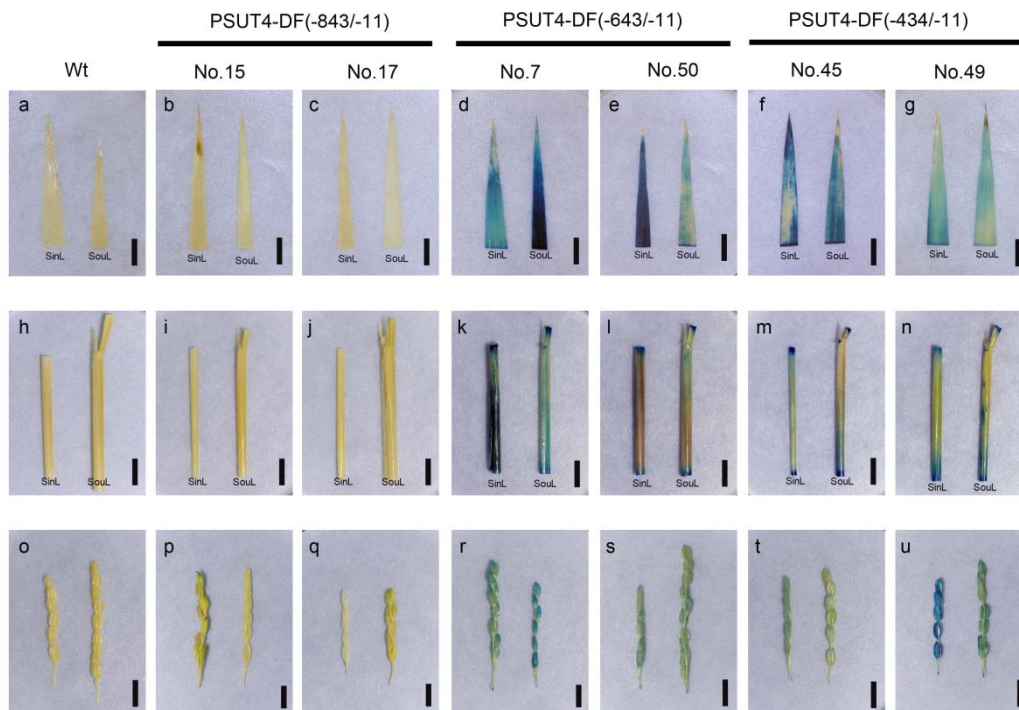
分別使用濃度為標定 Biotin 碳針之 0、0.5 與 1X 之未標定 Biotin 之 DF(-550/-484) 探針 (Cold probe) 與標定之 DF(-550/-484) 探針進行競爭型結合分析。BH-LS NE : before heading leaf sheath nuclear extract ; AH-LS NE : after heading leaf sheath nuclear extract ; S : shift band 。

Figure 26、**Competition EMSA analysis of *OsSUT4* promoter fragments.** Competition EMSAs were performed with 0, 0.5-fold, 1-fold unlabeled DF(-550/-484) DNA probes (Cold probes) and labeled DF(-550/-484) DNA probe. BH-LS NE : before heading leaf sheath nuclear extract ; AH-LS NE : after heading leaf sheath nuclear extract ; S : shift band.



圖二十七、*OsSUT* promoter::GUS 穩定性表現質體建構圖

Figure 27、Stable expression *OsSUT4* 5' deletion promoter construct map. Stable expression cassettes, containing *OsSUT4* 5' deletion promoter fragments, *ubiquitin* intron 1, *GUS* reporter gene, and 3' terminator of *HVA22* were cloned into *SacI*-*HindIII* digested pCambia1302 vectors.

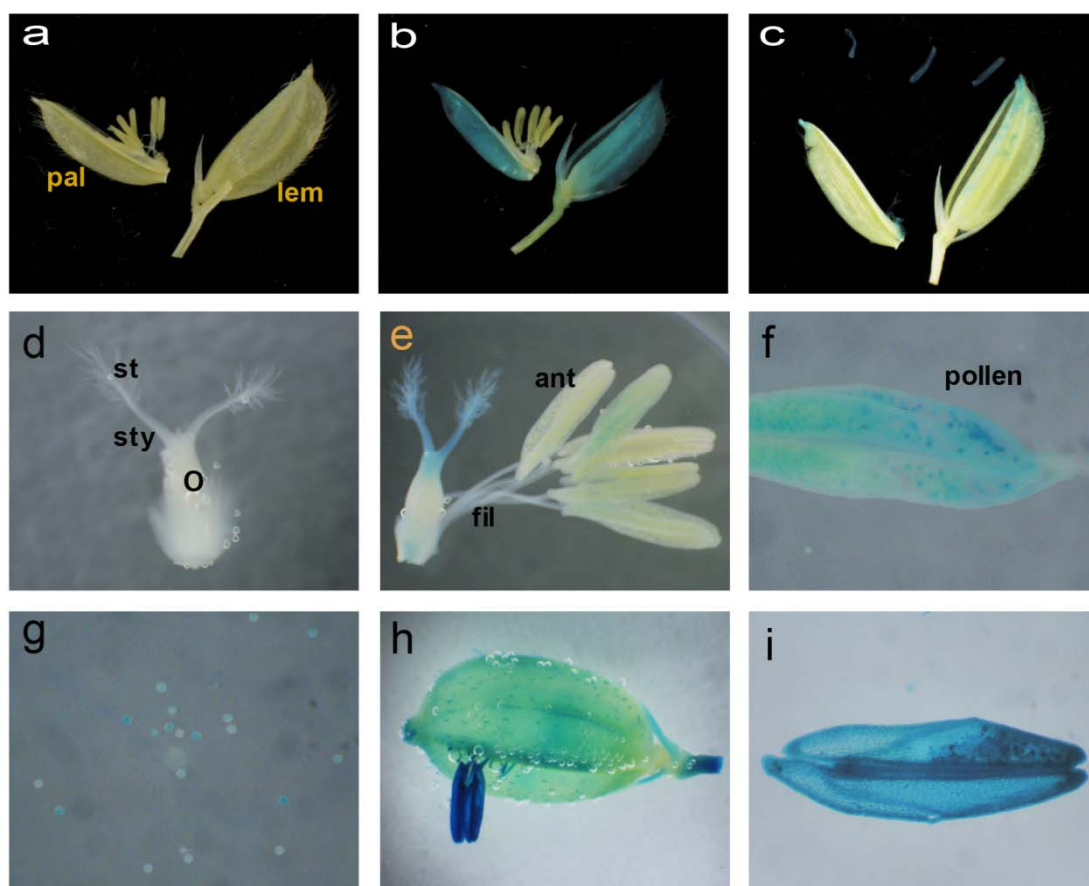


圖二十八、*OsSUT* promoter::*GUS* 質體於轉殖水稻植株之表現

分別取葉身(a-g)、葉鞘(h-n)與幼花穗(o-u)進行 *GUS* 組織染色分析。

(a、h、o)為對照組；(b、i、p) 與(c、j、q)分別為 PSUT4-DF(-843/-11)編號 15 與 17 之轉殖株；(d、k、r) 與(e、l、s)分別為 PSUT4-DF(-643/-11)編號 7 與 50 之轉殖株；(f、m、t) 與(g、n、u)分別為 PSUT4-DF(-434/-11)編號 45 與 49 之轉殖株。SinL：Sink leaf，為抽穗前採收之材料；SouL：Source leaf，為抽穗後採收之材料。黑色表示 1 公分。

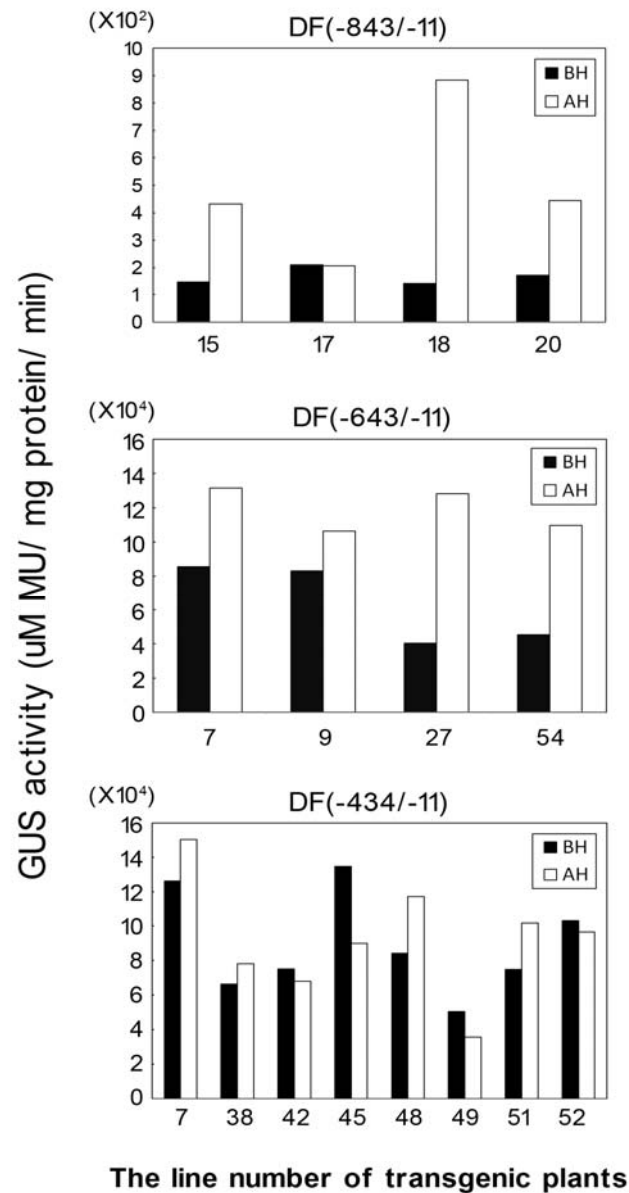
Figure 28、**GUS staining of transgenic rice.** The leaf blade (a-g), leaf sheath (h-n) and young panicle (o-u) from plants expressing PSUT4-DF(-643/-11) (d-e, k-l, r-s) and PSUT4-DF(-434/-11) (f-g, m-n, t-u) constructs were detected by *GUS* staining. (b, l, p) and (c, j, q) were transgenic line no. 15 and no. 17 of PSUT4-DF(-843/-11), respectively. (d, k, r) and (e, l, s) were transgenic line no. 7 and no. 50 of PSUT4-DF(-643/-11), respectively. (f, m, t) and (g, n, u) were transgenic line no. 45 and no. 49 of PSUT4-DF(-434/-11), respectively. (a, h, o) indicated wild-type plant. SinL : Sink leaf ; SouL : Source leaf. Bar in a-u, 1 cm.



圖二十九、*OsSUT* promoter::*GUS* 質體於轉殖水稻穎花之表現

(a) 與(d)為對照組，(b, e-i)為 PSUT4-DF(-434/-11)/49 轉殖系。(b)與(c)分別為孕穗期與開花後之水稻穎花；(e-g)為花軸已抽出葉鞘，但尚未開花之穎花雌蕊、雄蕊、花藥與花絲之 GUS 染色結果；(h、i)分別為剛開完花之穎花與其花藥。lem：lemma；pal：palea；o：ovary；sty：style；st：stigma；ant：anther；fil：filament。

Figure 29、GUS staining of spikelet. (a, d) were wild-type plant, (b, e-i) were PSUT4-DF(-434/-11)/49 transgenic line. (b, c) were spikelet at booting and flowering stages, respectively. (e- g) samples were collected from spikelets pre flowering. (h, i) samples were from spikelets after flowering. lem：lemma；pal：palea；o：ovary；sty：style；st：stigma；ant：anther；fil：filament.



圖三十、*OsSUT* promoter::GUS 質體於轉殖水稻之啟動子活性分析

收集抽穗前 3-5 天與抽穗後 10-15 天轉殖水稻-2 葉葉鞘，進行 DF(-843/-11)、DF(-643/-11)與 DF (-434/-11)啟動子之 GUS 活性分析。

(■)BH : before heading (□)AH : after heading

Figure 30、Stable expression of *OsSUTs* promoters in transgenic plants. GUS activities analysis of DF(-843/-11), DF(-643/-11) and DF(-434/-11) promoter fragments in sink leaf sheaths (3-5 days before heading) and source leaf sheaths (10-15 days after heading) of transgenic plants. (■)BH : before heading (□)AH : after heading.

附錄一、木村氏水耕液配方

A solution (500X, 1L)	
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	24.1 g
KNO_3	9.25 g
MgSO_4 或 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	33.0 g 或 67.5 g
KH_2PO_4	12.4 g

B solution (500X, 1L)	
Fe-citrate	7.5 g (須加熱溶解)
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 或 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	30 g 或 43.1g
12N HCl	41.67 mL

C solution (1000X, 1L)	
H_3BO_3	0.155 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.034 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.058 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.013 g
H_2MoO_4 或 MoO_3	0.008 g 或 0.007g

從 A,B,C solution 各取 1 mL 補自來水至 1L，調整 pH4.6~4.8 即可使用

附錄二、水稻肥料施加表

氮：100 kg/ha = 100 kg/500,000 個小 pot = 0.2 g/小 pot = 0.5 g/大 pot

硫酸銨 - 含氮量 20% - 白色略透明粒狀

$0.5 / 20\% = 2.5$ 2.5×2 (2 倍) = 5 g

尿素 - 含氮量 46% - 白色結晶狀

$0.5 / 46\% = 1.1$ 1.1×2 (2 倍) = 2.2 g

磷：100 kg/ha = 100 kg/500,000 個小 pot = 0.2 g/小 pot = 0.5 g/大 pot

過磷酸鈣 - 含磷量 18% - 灰色不透明，不規則粒狀

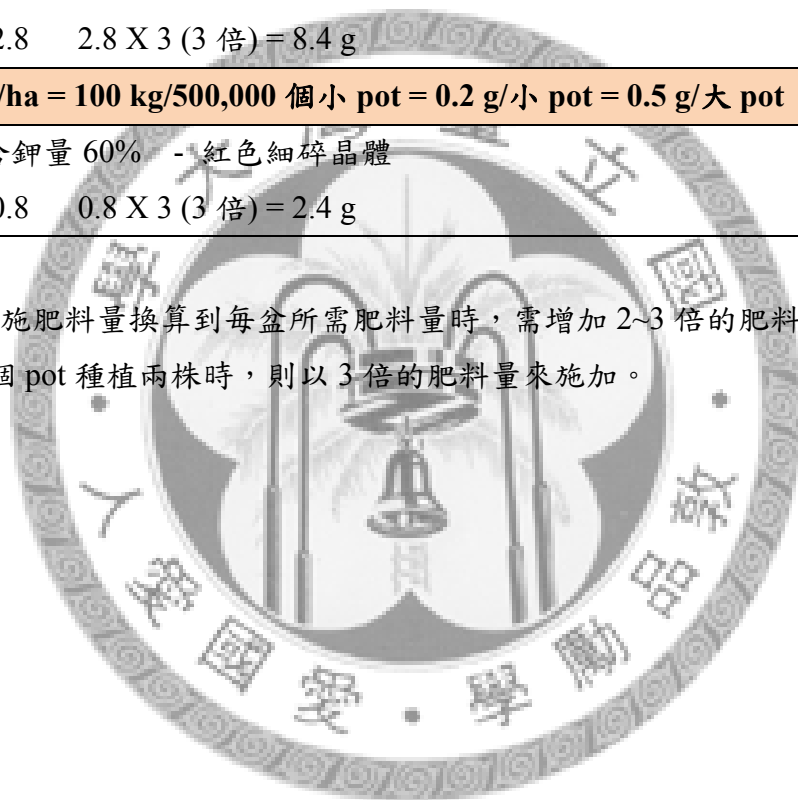
$0.5 / 18\% = 2.8$ 2.8×3 (3 倍) = 8.4 g

鉀：100 kg/ha = 100 kg/500,000 個小 pot = 0.2 g/小 pot = 0.5 g/大 pot

氯化鉀 - 含鉀量 60% - 紅色細碎晶體

$0.5 / 60\% = 0.8$ 0.8×3 (3 倍) = 2.4 g

由每公頃所施肥料量換算到每盆所需肥料量時，需增加 2~3 倍的肥料量。若使用小 pot，每個 pot 種植兩株時，則以 3 倍的肥料量來施加。

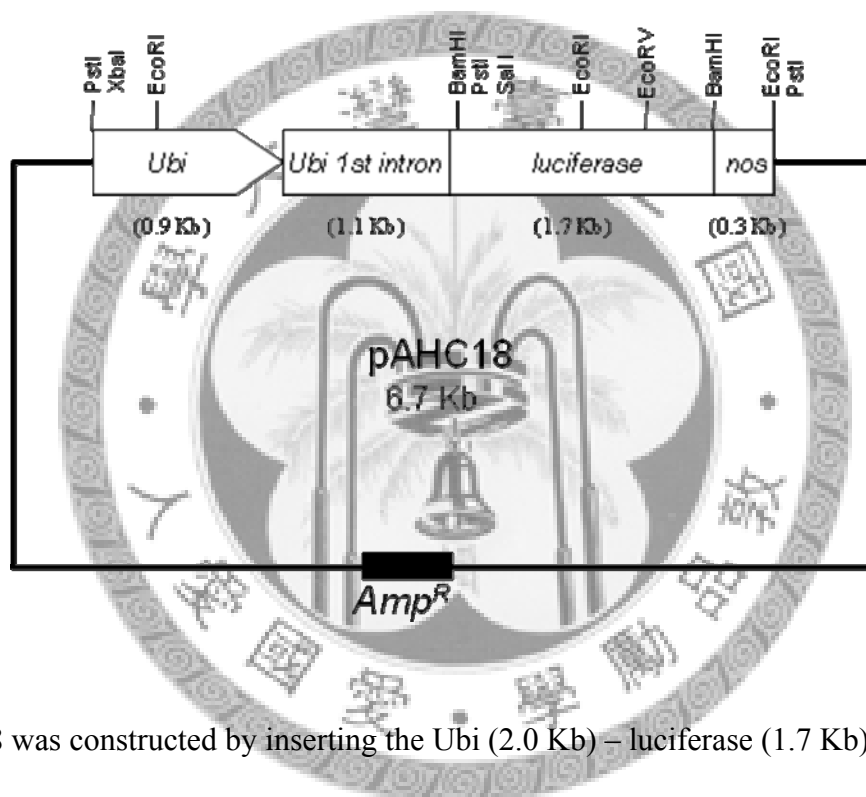


附錄三、pAHC18 map

NAME OF CLONE pAHC18

INSERT Ubi+Luciferase+3' nos

VECTOR pBlueScript



pAHC18 was constructed by inserting the Ubi (2.0 Kb) – luciferase (1.7 Kb) – nos (0.3 Kb) into the pUC18 (2.7 Kb).

Antibiotic: Ampicillin

附錄四、水稻基因轉殖各培養機配方

1. Callus Induction Medium (CIM)	
N6 salts	3.98 g
N6 vitamins (1000X) ¹	1 mL
Sucrose	30 g
Casamine acids	1 g
2,4-D ²	5 mL
Proline	2.8 g

補蒸餾水至 1L，調整 pH5.7 後加入 Phytigel 3 g，以 121°C 滅菌 15 分鐘。

¹ **N6 vitamins (1000X stock)**
Nicotinic acid 0.05 g / Thiamine HCl 0.1 g
Pyridoxin HCl 0.05 g / Myo-inositol 10 g
補滅菌水至 100 mL，放置 4°C

² **2,4-D 配法**
以 1 mL 50% ethanol 溶解 40 mg 2,4-D 粉末，補蒸餾水 99 mL，配置成 0.4 mg/mL 之儲存液，放置 4°C 冰箱備用。

2. CIM-CH	
1 L 之 CIM 培養基滅菌後，待冷卻至約 40°C 加入 1 mL Cefotaxime ¹ (1000X) 及 0.5 mL Hygromycin ² (2000X) 混合均勻分裝使用。	
¹ Cefotaxime (1000X stock) 以 4 mL 滅菌水溶解 1 g Cefotaxime 粉末，配置成 250 mg/mL 之儲存液，放置 -20°C 冰箱備用。	
² Hygromycin (2000x stock) 以 4 mL 滅菌水溶解 0.4 g Hygromycin 粉末，配置成 100 mg/mL 之儲存液，放置 -20°C 冰箱備用。	

3. AB minimal medium

20X Buffer A (phosphate buffer)

K ₂ HPO ₄	60 g
NaH ₂ PO ₄	20 g

20X Buffer B (salts buffer)

NH ₄ Cl	20 g
MgSO ₄ • 7H ₂ O	6 g
KCl	3 g
CaCl ₂	0.2 g
FeSO ₄ • 7H ₂ O	0.05 g

20X Buffer A 與 B 分別補蒸餾水至 1L，調整 pH 5.7 後以 121°C 滅菌 15 分鐘。

50X Glucose solution

25 g glucose 溶於 100 mL 滅菌水中。

50 mL 20X Buffer A、50 mL 20X Buffer B 與 20 mL 50X Glucose solution 補無菌水至 1L 後使用。

4. Co-culture, 2N6SA medium

N6 salt	3.98 g
N6 vitamins (1000X) ¹	1 mL
Sucrose	30 g
Casamine acids	1 g
2,4-D ²	5 mL
Glucose	10 g

補蒸餾水至 1L，調整 pH5.2 後加入 Phytigel 3 g，以 121°C 滅菌 15 分鐘，待冷卻後加入 1 mL Acetosyringone (AS)³。

¹ **N6 vitamins (1000X stock)** -配法同 CIM 培養基。

² **2,4-D 配法**-配法同 CIM 培養基。

³ **Acetosyringone**

以 DMSO 溶解 Acetosyringone 粉末，配製成濃度 0.2 M 之儲存液，放置 -20°C 冰箱備用。

5. Pre-regeneration medium (PM)

N6 salt	3.98 g
N6 vitamins (1000X) ¹	1 mL
Sucrose	30 g
Casein	0.5 g
Proline	2.8 g
Sorbitol	90 g
NAA ²	1 mL
BAP ³	1 mL

補蒸餾水至 1L，調整 pH5.7 後加入 Phytigel 3 g，以 121°C 滅菌 15 分鐘。

¹ **N6 vitamins (1000X stock)**- 配法同 CIM 培養基。

² **NAA 配法**

以 1 mL 1N NaOH 溶解 100 mg NAA 粉末，補蒸餾水 99 mL，配置成 1 mg/mL 之儲存液，放置 4°C 冰箱備用。

³ **BAP 配法**

以 1 mL 1N NaOH 溶解 50 mg BAP 粉末，補蒸餾水 99 mL，配置成 0.5 mg/mL 之儲存液，放置 4°C 冰箱備用。

6. Regeneration medium (RM)

N6 salt	3.98 g
N6 vitamins (1000X) ¹	1 mL
Sucrose	30 g
Casamino acids	1 g
NAA ²	0.5 mL
Kinetin ³	1 mL

補蒸餾水至 1L，調整 pH5.7 後加入 Phytigel 4 g，以 121°C 滅菌 15 分鐘。

¹ **N6 vitamins (1000X stock)**- 配法同 CIM 培養基。

² **NAA 配法**- 配法同 PM 培養基。

³ **Kinetin 配法**

以 0.5 mL 1N NaOH 溶解 250 mg Kinetin 粉末，補蒸餾水至 50 mL，配置成 5 mg/mL 之儲存液，放置 4°C 冰箱備用。

7. Root induction medium (MS)

MS salt	4.4 g
MS vitamins (1000X) ¹	1 mL
Sucrose	30 g

補蒸餾水至 1L，調整 pH5.7 後加入 Phytigel 4 g，以 121°C 滅菌 15 分鐘。

¹ **MS vitamins (1000X stock)**

Nicotinic acid 0.125 g / Thiamine HCl 0.025 g

Pyridoxine HCl 0.125 g / Myo-inositol 2.5 g

Glycine 0.6 g

補滅菌水至 250 mL，放置 4°C 保存。

