

國立臺灣大學生物資源暨農學院農藝學系

碩士論文

Department of Agronomy  
College of Bioresources and Agriculture

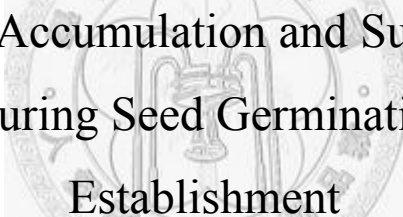
National Taiwan University

Master Thesis

水稻種子發芽及幼苗期胚中

澱粉累積及蔗糖轉運之研究

Studies on Starch Accumulation and Sucrose Transport in  
Rice Embryos during Seed Germination and Seedling  
Establishment



劉祥霖

Shiang-Lin Liu

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

# 第一部份

水稻幼苗生長時期胚中暫存性澱粉累積之調控機制

**Regulation of Starch Accumulation in Embryos during Rice Seedling  
Establishment**



水稻種子發芽時期葡萄糖影響胚中蔗糖轉運蛋白基因表現之  
訊息傳導途徑

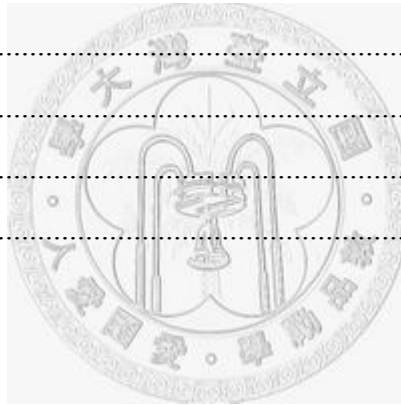
**Signal Transduction of Glucose-regulated Sucrose Transporter Gene  
Expressions in Germinating Embryos**

# 目錄

目錄 .....	II
圖表目錄 .....	III
縮寫對照表 .....	IV

## 第一部份

題目：水稻幼苗生長時期胚中暫存性澱粉累積之調控機制 .....	1
中文摘要 .....	2
英文摘要 .....	3
前言 .....	4
材料與方法 .....	9
結果 .....	18
討論 .....	21
參考文獻 .....	24
圖表 .....	30



## 第二部分

題目：水稻種子發芽時期葡萄糖影響胚中蔗糖轉運蛋白基因表現之訊息傳導途徑 .....	37
中文摘要 .....	38
英文摘要 .....	39
前言 .....	40
材料與方法 .....	46
結果 .....	50
討論 .....	54
參考文獻 .....	58
圖表 .....	63

## 圖表目錄

### 第一部份：水稻幼苗生長時期胚中暫存性澱粉累積之調控機制

圖一、水稻幼苗生長初期胚延伸組織及種子內之澱粉累積及含量變化情形 .....	30
圖二、去除胚延伸組織(shoot)對於胚中暫存性澱粉累積之影響 .....	31
圖三、黑暗處理對於胚中暫存性澱粉累積之影響 .....	32
圖四、黑暗處理對胚中水溶性醣類含量之影響 .....	33
圖五、黑暗處理對胚中澱粉生合成酵素 GBSS, SBE 之基因表現的影響 .....	34
圖六、黑暗處理對於水稻胚中澱粉水解酵素 $\alpha$ -amylase 活性的影響 .....	35
圖七、水稻幼苗生長時期碳水化合物由胚乳運至胚及新生組織之過程示意圖 .....	36

### 第二部分：水稻種子發芽時期葡萄糖對胚中蔗糖轉運蛋白基因之表現調控機制

圖一、不同葡萄糖濃度對水稻分離胚培養一天及五天後，植株之生長情形 .....	63
圖二、不同葡萄糖濃度對水稻分離胚培養一天及五天後，對 <i>OsSUT1</i> 基因表現之影響 .....	64
圖三、不同生育時間處理葡萄糖對水稻分離胚生長及 <i>OsSUT1</i> 表現之影響 .....	65
圖四、不同葡萄糖濃度對水稻分離胚培養一天及五天後，對 <i>OsSUT2</i> 基因表現之影響 .....	66
圖五、葡萄糖和六碳糖激酶(Hexokinase)抑制劑 N-acetylglucosamine 對水稻分離胚培養一天後植株的生長情形和對 <i>OsSUT1</i> 基因表現之影響 .....	67
圖六、葡萄糖和六碳糖激酶(Hexokinase)抑制劑 N-acetylglucosamine 對水稻分離胚培養五天後植株的生長情形和對 <i>OsSUT1, 2</i> 基因表現之影響 .....	68
圖七、葡萄糖及葡萄糖類似物 3-OMG 對水稻分離胚培養一天後植株的生長情形和對 <i>OsSUT1</i> 基因表現之影響 .....	69
圖八、葡萄糖及葡萄糖類似物 3-OMG 對水稻分離胚培養五天後植株的生長情形和對 <i>OsSUT1, 2</i> 基因表現之影響 .....	70
圖九、水稻種子發芽時胚中 ABA 含量變化及外加葡萄糖對胚中 ABA 敏感基因 <i>Rab16a</i> 表現之影響 .....	71

## 縮寫對照表

ABA	Abscisic acid
AGPase	ADP-glucose pyrophosphorylase
ATP	Adenisine-5-triphosphate
BSA	Bovine Serum Albumin
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
dai	days after imbibition
EDTA	Ethylene diamietetraacetic acid
Em	Embryo
En	Endosperm
G6PDHase	Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase
GBSS	Granule-bound starch synyhase
Glc	Glucose
HXK	Hexokinase
Mal	Maltose
3-OMG	3-O-methylglucose
MOPS	3-N-morpholino propanesulfonic acid
MS	Murashige and Skoog
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate
NAG	N-acetylglucosamine
PGI	Phosphoglucose isomerase
RT-PCR	Reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SBE	Starch branch enzyme
SPS	Sucrose phosphate synthase
SS	Starch synthase
SSS	Soluble starch synthase
SUT	Sucrose transporter
Ubi	Ubiquitin

# 第一部份

水稻幼苗生長時期胚中暫存性澱粉累積之調控機制

**Regulation of Starch accumulation in Embryos during Rice  
Seedling Establishment**



## 中文摘要

水稻種子發芽及幼苗生長時，發育中的莖葉及根組織主要之能量來源為胚乳澱粉分解生成之醣類：葡萄糖及麥芽糖。種子發芽時，葡萄糖及麥芽糖由胚乳運入胚中並可進一步被轉變為蔗糖以運至胚中其他部位，或由維管束組織運至生長中的莖葉或根組織，此為其生長發育之主要能量來源；運至胚中之醣類亦會重新合成澱粉並暫時儲存於胚中，於種子發芽初期短暫累積於胚盤組織，之後胚中澱粉主要累積部位則轉移至胚軸維管束組織周圍。由去除莖葉組織造成胚中澱粉過量累積或將植株移至全黑暗處理抑制光合作用造成胚中澱粉減少之現象，推測莖葉等積儲組織對碳素的需求會影響胚中澱粉之代謝。並且，由黑暗處理後胚中澱粉代謝酵素  $\alpha$ -amylase 之活性並未受到影響，而澱粉合成酵素 *granule-bound starch synthase (GBSS) I, II* 及 *starch branching enzyme(SBE) I, II, IV* 基因表現受到抑制，推測澱粉合成酵素扮演黑暗處理下胚中澱粉代謝之調控關鍵角色，並由黑暗處理後胚中水溶性醣類含量下降及黑暗處理同時外加葡萄糖後 *SBEIII* 表現相較黑暗處理有升高之現象，推測黑暗處理下水溶性醣類含量亦為胚中澱粉之代謝調控之間接調控因子。

## Abstract

Endosperm starch would be hydrolyzed to glucose and maltose and further being sent to the newly synthesized shoot and root through embryo during rice (*Oryza sativa* L.) seed germination and seedling establishment. In embryos, the soluble sugar from endosperm could be converted to starch and transiently accumulated in scutellums for few days. Following, the starch resynthesis was began to be presented in the cells surrounding the vascular bundles of embryos. Since the hyperaccumulation of starch in embryo tissues was observed in shoot-removing seedlings and low levels of starch content were found in low-photosynthetic efficiency seedling embryos in dark conditions, it was suggested that the amount of starch biosynthesis in embryo tissues were depended on the sink tissue demand. According to the expressions of *granule-bound starch synthase (GBSS) I, II*, and *starch branching enzyme (SBE) I, II, IV* responsive to dark treatment, it indicated that the starch level in embryo tissues of growing seedlings in dark was mainly controlled by starch synthetic efficiency. Moreover, *SBEIII* expression in dark was recovered when glucose was supplied into medium. It was suggested that sugar may function as one of the factors to regulate *SBE III* gene expression in embryos of young seedlings.



## 前言

### 1. 禾穀類作物種子發芽及幼苗生長時期種子內部碳水化合物之運輸

水稻種子由外而內主要可分為以下幾類組織：外殼(hull or husk)，其為整個種子之最外層，功用為保護種子，外殼內為果皮層(pericarp)，而胚(embryo)及胚乳(endosperm)佔種子大部分體積，胚乳為儲存澱粉之組織，其外為糊粉層(aleurone layer)包圍；胚又可依其構造分為胚軸(embryonic axis)、胚芽(plumule)、胚根(radicle)、外胚層(epiblast)及胚盤(scutellum)等部分。胚軸為胚內之維管束組織，分成上、下胚軸，上胚軸(epicotyl)位於胚芽中，下胚軸(hypocotyl)則位於胚根內；胚中靠近胚乳之部分為胚盤組織，其包含了上皮層(epithelium)、基本組織及維管束組織；上皮層與胚乳接觸，負責分泌及養分吸收，是控制種子萌發的重要部位(Yung et al., 1938; Edelman et al., 1959; Shinke, 1988; Matsuo and Hoshikawa, 1993; Kaneko et al., 2002)。

禾穀類作物種子發芽時新生組織主要養分來源為胚乳中儲存之澱粉(starch)，已知水稻種子浸潤後，萌芽中的胚會釋出吉貝素(gibberellins)，其會促使胚盤以及糊粉層細胞產生澱粉水解酵素  $\alpha$ -amylase，並運至胚乳中以分解胚乳之澱粉(Murata, 1968; Bewley and Black, 1994)。水稻及小麥於種子浸潤一天後(days after imbibitions, dai)胚乳中主要水溶性糖類為蔗糖(sucrose)，而胚乳中葡萄糖(glucose)及麥芽糖(maltose)含量在浸潤三至四天後快速增加，並於浸潤十二天後達到最大量，推測胚乳澱粉分解後的主要產物為葡萄糖及麥芽糖(Murata, 1968; Bewley and Black, 1994; Aoki et al., 2006; Scofield et al., 2007)。澱粉分解產生之葡萄糖及麥芽糖會進一步被運送至胚盤以供生長中的組織利用。於水稻或玉米的分離胚之培養基中外加葡萄糖或蔗糖，分離胚皆可利用此兩種水溶性糖類並繼續生長(Matsukura et al., 2000)，且於小麥胚盤表層細胞發現有糖類轉運蛋白(hexose transporter)基因之表現，其可能於此負責將糖類由胚乳運載至胚中(Edelman et al., 1959; Bewley and Black, 1994)，推測胚盤表層細胞具有運入葡萄糖與蔗糖之能力。

而水稻及小麥胚於萌芽時其內主要醣類為葡萄糖和蔗糖，並且隨著胚之發育而蔗糖含量逐漸增高，直至浸潤十一天後才有下降的趨勢(Nomura et al., 1969; Matsukura et al., 2000; Aoki et al., 2006; Scofield et al., 2007)。由浸潤四天後胚盤內蔗糖磷酸合成酶(sucrose phosphate synthase)活性會快速上升，並於浸潤六天後其活性達到最高後逐漸下降，推測由胚乳運入胚中的醣類可能在胚盤中會進一步轉變成蔗糖，並藉由維管束組織運至莖、葉及根組織利用(Nomura et al., 1969; Scofield et al., 2007)。

## 2. 禾穀類作物種子萌芽及幼苗生長時期胚中暫存性澱粉之碳源及其累積情形

澱粉為植物組織內碳水化合物主要儲存形式，依其出現之部位或累積時間長短，可區分為儲存性澱粉(storage starch)或暫存性澱粉(transitory starch)。儲存性澱粉主要出現於種子中或儲存組織如馬鈴薯塊莖、甘藷塊根或是水稻胚乳等，而暫存性澱粉一般存在於植物之光合作用組織中(Peavey et al., 1977; Lu and Sharkey, 2004; Lu and Sharkey, 2006; Lu et al., 2006)，其於白天植物行光合作用時累積，而於夜晚時分解，以作為植物夜晚時之碳素來源，或轉變為蔗糖之形式運至積儲組織；而水稻成株葉鞘中所累積之暫存性澱粉則為穀粒充實時，劍葉光合作用產物外最主要之碳素來源(Watanade et al., 1997; Ishimaru et al., 2004; Chen et al., 2008)。

於 Brown 及 Morris(1890)所發表的研究指出大麥之分離胚於水中培養數小時後，可在胚中發現暫存性澱粉之累積。而水稻種子於萌芽初期之胚中亦可觀察到暫存性澱粉累積的現象(Toyofuku et al., 1998; Matsukura et al., 2000; Chen, 2006; Scofield et al., 2007)。並且水稻胚中暫存性澱粉隨植株生長而會累積在特定組織中，於第一葉完全展開時，胚中澱粉主要累積在胚盤上皮層及胚軸維管束組織旁的薄壁細胞(Toyofuku et al., 1998; Matsukura et al., 2000; Chen, 2006; Scofield et al., 2007)；而本實驗室之研究進一步發現其於第二葉展開時，胚盤上皮層之暫存性澱粉消失，而在同一時間澱粉累積部位主要出現於胚軸維管束組織旁的薄壁細胞，

並至第四葉展開時才消失(Chen, 2006)。

雖然成熟種子胚中亦存有脂質及碳水化合物，然而胚中暫存性澱粉之碳源為由胚乳運入胚之碳水化合物。在本實驗室過去之研究發現水稻種子於浸潤三天後，將胚分離並在含有 100 mM 葡萄糖之培養基中培養，發現胚中有澱粉之累積，但於不含糖之培養則無澱粉之累積；於 Brown 及 Morris(1890)之研究中，將大麥分離胚於水中培養五天至六天後，將其移至含蔗糖、葡萄糖或麥芽糖之培養基中，則可於胚盤內觀察到澱粉之累積；推測水稻及大麥種子萌芽時胚中所累積澱粉之碳源為由胚乳運入胚之碳水化合物。

### 3. 暫存性澱粉之代謝機制

澱粉之代謝可分為澱粉合成及分解兩大部分，目前已知，ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase)、Starch synthase (SS)及 Starch branch enzyme (SBE, Q-enzyme)等酵素參與在澱粉合成途徑(Smith et al., 1997)。AGPase 主要功能為合成 ADP-glucose，其為澱粉形成之前趨物(Möhlmann et al., 1997; James et al., 2003)；AGPase 蛋白分別由大及小次單元組成，如水稻中已找到 *OsAPSI*, *OsAPS2* 等小次單元及 *OsAPL1*, *OsAPL2*, *OsAPL3* 及 *OsAPL4* 等大次單元之相關基因(Akihiro et al., 1977)。

澱粉依其組成結構，可分為葡萄糖由 $\alpha$ -1,4鍵結所形成之直鏈澱粉(amylose)或由 $\alpha$ -1,6鍵結所形成之支鏈澱粉(amylopectin)，而SS為一群參與在直鏈澱粉及支鏈澱粉合成之酵素，其功能為將ADP-glucose之葡萄糖基(glucosyl)接至澱粉之葡萄糖鏈，依其蛋白是否和澱粉粒(starch)黏附，分為Granule-bound starch synthase (GBSS)或是Soluble starch synthase (SSS)。GBSS負責直鏈澱粉之合成，且其有GBSSI及GBSSII兩種形式(Tsai, 1974)，GBSSI一般出現於儲存器官(Smith et al., 1997)，然而於甘藷中發現其亦會於莖及葉中出現(Wang et al., 1999)，而GBSSII則主要存在於其他器官中(Denyer et al., 1997; Nakamura et al., 1998; Vrinten and Nakamura., 2000)。

SSS則位於胞器之基質(stroma)內，負責支鏈澱粉之延長，目前已知SSS蛋白有SSSI, SSSII, SSSIII及SSSIV等不同種形式，且每個不同形式之SSS皆由一小群基因家族控制(Marshall et al., 1996; Hirose and Terao, 2004; Dian et al., 2005)。SBE則負責支鏈澱粉之形成，目前已知SBE主要依照其基因序列可分為A和B二群(Burton et al., 1995)，一般來說，A群SBE偏好於支鏈澱粉上新增支鏈，而B群則偏好於直鏈澱粉添加支鏈，已知水稻SBE共有SBE I, III, IV等不同種形式，SBE I屬於B群，而SBE III屬於A群(Beck and Ziegler, 1989; Nakamura and Yamanouchi, 1992; Burton et al., 1995; Smith et al., 1997; Chen et al., 2004)。

暫存性澱粉之分解主要由 $\alpha$ -amylase 或 $\beta$ -amylase 進行水解途徑或是由磷解酶(phosphorylase)以進入磷酸化途徑；近年來已有多篇研究發現植物葉中暫存性澱粉於夜晚進行水解，並將碳水化合物轉變為蔗糖形式運至積儲組織(Weise et al., 2004; Smith et al., 2005; Lu and Sharkey, 2006; Lu and Sharkey et al., 2006; Weise et al., 2006)。 $\alpha$ -amylase 為澱粉內切酶，其可將澱粉之長碳鏈切為葡聚糖(glucan)，而 $\beta$ -amylase 則為外切酶，其可於澱粉碳鏈末端作用並生成麥芽糖。已知阿拉伯芥葉中暫存性澱粉主要由 $\beta$ -amylase 產生麥芽糖，麥芽糖再轉變成蔗糖後，藉由維管束組織運至需求組織(Yu et al., 2005)，而於水稻中發現 $\alpha$ -amylase 會參與葉中暫存性澱粉之分解(Asatsuma et al., 2005)，而菠菜葉中暫存性澱粉則主要由 $\alpha$ -amylase 進行分解(Steup et al., 1983)，可知不同物種中暫存性澱粉之分解亦會藉由不同酵素進行。

#### 4. 本論文研究主題

雖然之前已有多篇研究發現禾穀類作物種子發芽時胚中會有澱粉之累積，但至目前為止，仍無更進一步的研究探討水稻幼苗期胚中暫存性澱粉累積之生理意義及其代謝調控機制；然而，於水稻幼苗生長時期，胚乳之澱粉(供源)與莖葉或是根組織(積儲)間的碳水化合物及能量之調控與植物之生理發育息息相關，為了瞭解

水稻胚中暫存性澱粉之生理意義及其代謝之調控機制，本研究首先藉由碘液染色及利用酵素反應定量的方式觀察水稻幼苗發育時期胚中澱粉含量變化，接著藉由改變此一時期之積儲組織活性，分別由移除積儲組織莖和葉部或以黑暗處理使積儲組織對於碳的需求提高，並觀察其是否對供源(胚中澱粉)造成影響；並進一步由胚中水溶性醣類之含量、澱粉代謝酵素之活性或基因表現變化，期能更瞭解水稻幼苗發育時期胚中暫存性澱粉之生理意義及其調控機制。



# 材料與方法

## 1. 植物材料

水稻植物材料為高雄農改場提供的 94 年第二期台農 67 號水稻種子 (*Oryza sativa* L. cv. Tainung 67)。

## 2. 水稻胚延伸組織中暫存性澱粉功能分析

### 2.1. 種子消毒和發芽處理

- (1) 將水稻種子以 1% 次氯酸鈉(NaOCl)消毒 20 分鐘，以自來水沖洗數次後，置於鋪有濕潤拭手紙培養皿中。
- (2) 黑暗 37°C 培養箱培養三天。
- (3) 將萌芽之水稻種子移至 30°C (日溫)/25°C (夜溫) 的人工氣候室以自來水及自然光照培養，並每隔三天換水。

### 2.2. 去除芽處理

- (1) 參考步驟 2.1 進行水稻種子消毒及發芽處理。
- (2) 自然光照培養三天後(6 days after imbibitions (dai))，將水稻莖葉(shoot)組織以刀片去除。
- (3) 之後每隔二天收取胚樣品進行澱粉含量測定，若有莖葉組織再生長出來則同樣利用刀片給予去除。

### 2.3. 黑暗處理

- (1) 參考步驟 2.1 進行水稻種子消毒及發芽處理。
- (2) 自然光照培養十四天天後(17 dai)，將水稻幼苗移入紙箱內並以黑布遮蔽。
- (3) 之後每隔一天收取胚樣品進行澱粉含量測定。

### 3. 碳水化合物分佈偵測及含量測定

#### 3.1. 水稻種子內澱粉分佈情形觀測

- (1) 將所收取之水稻種子以解剖刀去除芽、胚延伸組織及根後，再以解剖刀對半縱切。
- (2) 利用  $I_2/KI$  (0.05% KI, 0.005%  $I_2$ , 0.01N HCl) 進行染色 1 分鐘。
- (3) 以蒸餾水清洗 1 分鐘。
- (4) 自然風乾 5 分鐘後以解剖顯微鏡觀察。

#### 3.2. 水稻胚碳水化合物含量測定

本方法參考自 Mitchell (1998), Campbell 等人(1999), Spackman and Cobb (2001) 及 Smith and Zeeman (2006) 之文章並首先將樣品利用連續濃度梯度稀釋，以確定此流程可正確反應樣品內碳水化合物含量，並得到測定之方法。

##### 3.2.1. 碳水化合物之萃取及分離

- (1) 以每 10 個水稻胚為一重複樣品。
- (2) 以液氮並將樣品研磨至粉末狀，加入 1 ml 80%(v/v) 乙醇(Ethanol)後於 80°C 萃取 5 分鐘。
- (3) 4°C 3000×g 離心 10 分鐘。
- (4) 將上清液部分及沈澱物部分分開。
- (5) 上清液部分(水溶性醣類含量測定)：
  - (a) 取出上清液後並重複步驟 3~4 兩次，每次均將上清液吸至新的微量離心管中。
  - (b) 將樣品體積以 80%(v/v) 乙醇補齊至 1 ml，為水溶性糖類溶液。

(6) 沈澱物部分(澱粉含量測定)：

- (a) 加入 1 ml 80%(v/v)乙醇後並重複步驟 2~4 兩次，每次均將上清液去除。
- (b) 真空抽乾上清液後用 1.5 ml dH<sub>2</sub>O 懸浮沈澱物。
- (c) 於沸水中糊化 10~15 分鐘，並確定糊化物接近均質，為糊化澱粉液。

### 3.2.2. 澱粉含量測定

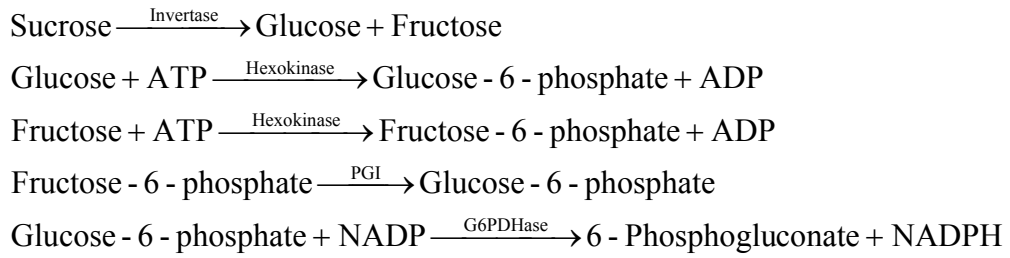
- (1) 取 40  $\mu$ l 糊化澱粉液補 dH<sub>2</sub>O 至 100 $\mu$ l，並同時配置 100  $\mu$ l 分別含有 0~50  $\mu$ g 澱粉之澱粉液一同進行下面步驟。
- (2) 加入 100  $\mu$ l 反應液 1(0.8 U amyloglucosidase (Sigma, USA)、0.1 U pullulanase (Sigma, Israel))。
- (3) 55°C 水浴槽作用 1 小時。
- (4) 100°C 作用 1 分鐘去除酵素活性。
- (5) 4°C 3000 $\times$ g 離心 10 分鐘。
- (6) 分別吸取 50  $\mu$ l 上清液至微量盤中，並加入 150  $\mu$ l 反應液 2 (1.1 mM Adenisine-5-triphosphate (ATP), 1.2 mM Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NADP<sup>+</sup>), 0.55U Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PDHase, ROCHE, Germany), TRA buffer, pH7.5)或反應液 3 (1.1 mM ATP, 1.2 mM NADP<sup>+</sup>, 0.55U G6PDH, 3.5U Hexokinase (Sigma, USA), TRA buffer, pH7.5) (TRA buffer: 0.3M triethanolamine hydrochloride/4.05mM MgSO<sub>4</sub> pH7.5)。
- (7) 混勻並反應 30 分鐘後，於 365nm 波長下讀取吸光值分別為 E1 或 E2。
- (8) 將 E2-E1 之數值帶入已知澱粉濃度溶液曲線，推算出樣品澱粉含量。

### 3.3.3. 水稻胚水溶性醣類含量測定

- (1) 本方法可同時測量葡萄糖、果糖及蔗糖含量。



- (2) 每個樣品取二管 100  $\mu$ l 水溶性醣類溶液以真空抽至乾燥。
- (3) 蔗糖樣品測量部分外加步驟：
  - (a) 測量蔗糖樣品以 250  $\mu$ l acetate buffer (0.1 M, pH4.6)(含 700U invertase (Sigma, Japan))溶解沈澱物，並於 55 $^{\circ}$ C 反應 30 分鐘。
  - (b) 100 $^{\circ}$ C 作用 1 分鐘去除酵素活性。
  - (c) 將樣品再以真空抽至乾燥。
- (4) 以 250  $\mu$ l TRA buffer 溶解沈澱物。
- (5) 配置已知葡萄糖濃度溶液(0~40  $\mu$ g glucose/250  $\mu$ l TRA buffer)，並一同進行以下步驟。
- (6) 100 $^{\circ}$ C 作用 1 分鐘去除酵素活性。
- (7) 4 $^{\circ}$ C 3000 $\times$ g 離心 10 分鐘。
- (8) 吸取 100  $\mu$ l 上清液至微量盤中，並加入 100  $\mu$ l 反應液 1(1.1 mM ATP, 1.2 mM NADP<sup>+</sup>, 0.55U G6PDHase, TRA buffer, pH7.5)，測量果糖樣品另加入 0.2U Phosphoglucose isomerase (PGI, Fluka, USA)。
- (9) 混勻後，於 340nm 波長下讀取吸光值為 E1。
- (10) 再加入 Hexokinase (0.4U/well)。
- (11) 混勻並反應 30 分鐘後，於 365nm 波長下讀取吸光值為 E2。
- (12) 利用所得到的 E2 及 E1 之吸光值相減後，和已知葡萄糖含量溶液比對可得樣品葡萄糖含量；果糖含量則由其數值與測葡萄糖樣品相減後，得到果糖含量；蔗糖含量則是利用所得到的數值與葡萄糖含量相減後，得到蔗糖莫耳數含量並換算。
- (13) 化學反應步驟如下表所示：



#### 4. 酵素活性及含量測定

##### 4.1. $\alpha$ -amylase 活性測定

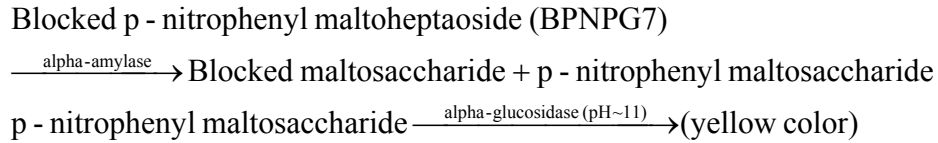
本實驗參考 Megazyme ALPHA-AMYLASE ASSAY PROCEDURE，使用之 Extraction buffer, Stopping Reagent 及 Amylase HR Reagent 皆購自 Megazyme 公司(Ireland)。

- (1) 以每 10 個水稻胚為一重複樣品。
- (2) 以液氮將樣品研磨至粉末狀，加入 1 ml extraction buffer(50mM sodium malate, 50mM sodium chloride, 2 mM calcium chloride, 0.005% sodium azide)。
- (3) 40°C 水浴中萃取 20 分鐘並不時搖晃。
- (4) 4°C 1,000×g 離心 10 分鐘，上清液即為蛋白質樣品。
- (5) 進行蛋白質樣品稀釋，吸取上清液 8  $\mu$ l 加入 192  $\mu$ l extraction buffer。
- (6) 將 100  $\mu$ l 稀釋液加入玻璃試管樣品中並於 40°C 預熱 5 分鐘。
- (7) 將 Amylase HR Reagent 於 40°C 預熱 5 分鐘。
- (8) 每個樣品加入 100  $\mu$ l Amylase HR Reagent。
- (9) 40°C，反應 20 分鐘。
- (10) 加入 stopping reagent(1% Tris-HCl pH8.5) 3 ml 後搖晃均勻。
- (11) 取 200  $\mu$ l 測定 O.D.400 數值。
- (12) 經過公式換算後得到樣品中酵素活性，活性計算公式如下：

Units/g

$$= \frac{\Delta E400}{\text{Incubation time}} \times \frac{\text{Total Volume in Cell}}{\text{Aliquot Assayed}} \times \frac{1}{E_{mM}} \times \frac{\text{Extraction Vol.}}{\text{Sample Weight}} \times \text{Dilution}$$

(13) 化學反應步驟如下表所示：



## 4.2. 蛋白質定量

本方法參考自 Bradford (1976)之方法，並利用 Bio-Rad 公司所生產之 Bradford dye 進行測定

- (1) 取 20  $\mu\text{l}$  蛋白質樣品加入 180  $\mu\text{l}$  0.1N 氫氧化鈉(NaOH)。同時利用 Bovine Serum Albumin, BSA, Biolabs)製作不同濃度蛋白溶液。
- (2) 4°C 10,000 $\times g$  離心 10 分鐘後去除上清液。
- (3) 加入 600  $\mu\text{l}$  dH<sub>2</sub>O 及 200 $\mu\text{l}$  Bradford dye(Bio-Rad, USA)。
- (4) 混和均勻後，測定 O.D.595 數值，並依照內插法算出樣品蛋白質濃度。

## 5. RNA 萃取及基因表現分析

### 5.1. RNA 萃取

- (1) 以每 10 個水稻胚為一重複樣品。
- (2) 以液氮並將研磨樣品至粉末狀，加入 1 ml Trizol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen, USA) 混和均勻。
- (3) 輕輕搖晃五分鐘待 Trizol 完全融化成液態。
- (4) 以 7,830 $\times g$ 、4°C 離心 5 分鐘。
- (5) 吸取上清液至新的離心管中並加入 0.2 ml Chloroform (Riedel-de Haen)。

- (6) 均勻混勻 3 分鐘。
- (7) 以  $11,270\times g$ 、 $4^{\circ}\text{C}$  離心 15 分鐘。
- (8) 小心取出上層液至新的離心管中並加入  $500\ \mu\text{l}$  100 % Isopropanol (Fluka)混勻。
- (9) 室溫靜置 10 分鐘。
- (10) 以  $13,230\times g$ 、 $4^{\circ}\text{C}$  離心 15 分鐘。
- (11) 去除上清液，並加入 1 ml 75 % 乙醇清洗沈澱物。
- (12) 以  $13,230\times g$ 、 $4^{\circ}\text{C}$  離心 15 分鐘。
- (13) 去除乙醇，以真空乾燥機乾燥。
- (14) 以  $40\ \mu\text{l}$  已滅菌含 0.1% diethyl pyrocarbonate (DEPC, Sigma, USA) 的  $\text{dH}_2\text{O}$  水加入萃取好的 RNA，於  $37^{\circ}\text{C}$  乾浴槽進行溶解 30 分鐘。
- (15) 以  $9,750\times g$ 、 $4^{\circ}\text{C}$  離心 3 分鐘，取上清液  $35\ \mu\text{l}$ 。
- (16) 以分光光度計測量 RNA 濃度。

## 5.2. RNA 電泳

- (1) 取  $1\ \mu\text{g}$  RNA 並加入  $10\ \mu\text{l}$  denature buffer (15 mL formamide, 0.6 ml formaldehyde, 3 ml 10X 3-N-morpholino propanesulfonic acid (MOPS, Amresco), 適量 ethidium bromide(Sigma))。
- (2) 於  $65^{\circ}\text{C}$  加熱 15 分鐘。
- (3) 將樣品置於冰上 10 分鐘。
- (4) 準備 RNA 膠體(1% agarose, 75% formaldehyde, 10% MOPS buffer(20 mM MOPS, 5 mM sodium acetate(Merck), 1 mM ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA, Merck), 0.01% DEPC, pH7))及電泳溶液(1% MOPS)。
- (5) 以 50 伏特電壓進行 1 小時電泳。

### 5.3. TURBO DNase 處理

利用 TURBO DNA-free™ kit (Ambion, USA) 去除 RNA 樣品中摻雜的 genomic DNA。

- (1) 取 6 µg RNA 樣品, 1X TURBO DNase buffer 及 2U TURBO DNase, 總反應體積至少為 20 µl。
- (2) 37°C 反應 30 分鐘。
- (3) 加入 4 µl inactivation reagent 於室溫作用 2 分鐘。
- (4) 以 10,000×g、4°C 離心 2 分鐘, 取上清液並保存於-20°C。

### 5.4. 即時反轉錄聚合酶連鎖反應(real-time RT-PCR)

使用 Stratagen SYBR® Green RT-PCR kit (Stratagene, USA), 並以 Stratagene MX3000P™ 機器進行 real-time RT-PCR, 之後以 Stratagene MxPro QPCR Software 3.00 版軟體進行分析獲得結果。

Real-time RT-PCR 反應總體積為 25 µl (1X master mix, 0.5 µM forward primer, 0.5 µM reverse primer, 18.75 µM reference dye, 200 ng RNA, 1 µl RT/RNase block enzyme mix), 反應程序為 50 °C 反轉錄 30 分鐘, 95 °C 變性 10 分鐘, 擴增反應為 95 °C / 1 分鐘、黏合溫度 / 1 分鐘、72 °C / 1 分鐘, 循環數為 40(黏合溫度見下表)。

進行 real-time RT-PCR 偵測基因表現時, 以 Ubiquitin 基因做為 internal control, 而 RNA 表現以此公式進行換算及比較(Normalization):

$$\text{Relative RNA expression level} = 2^{\text{ct}_{\text{Ubiquitin}}} / 2^{\text{ct}_{\text{Target gene}}}$$

## Real-time RT-PCR 引子列表

Gene	Accession number	Forward primer (5'→3') Reverse primer (5'→3')	Amplicon size (bp)	Annealing temperature(°C)
<i>GBSSI</i>	J04960	GCGAAGAAGTGGGAGAATG CACTACAACAAACAAACCACTG	200	52
<i>GBSSII</i>	AY069940	AACTGCATGGCTCAAGACCT ACAGGCAAATGCATGCCATC	350	52
<i>SBEI</i>	D11082	GCCCTAACTCATTCAAAGTCC TCTCCCCACTTGTTGCTTC	153	52
<i>SBEIII</i>	D16201	TGAGAACACCAAGAGGCAG CGCAAAGCACAAAAGCAAG	150	52
<i>SBEIV</i>	E14723	TTGAGGAGGAGGAAGAGATT TGGAGCCTGCACAGCAAAC	599	52
<i>Ubiquitin</i>	D12629	CGCAAGTACAACCAGGACAA TGGTTGCTGTGACCACACTT	101	52

引子設計參考自 Chen et al., 2008

## 結果

### 1. 水稻種子發芽時種子中澱粉累積部位及含量變化

為了瞭解水稻種子發芽時胚中暫存性澱粉之累積情形，首先藉由碘液染色及酵素分析法鑑定浸潤後 0 至 24 天(dai)之種子內澱粉的分佈位置及累積情況。由碘液染色結果顯示，乾燥之種子胚乳儲存大量澱粉，而於浸潤 6 天後靠近胚之胚乳澱粉已開始分解，並於浸潤 18 天後胚乳澱粉已完全分解(圖一 A)。乾燥種子胚中並未有澱粉之累積，但於浸潤 6 天後可於胚盤組織觀測到明顯澱粉之累積現象，而胚軸維管束組織周圍細胞亦有少量澱粉之累積，然而至浸潤後 12 天，胚盤澱粉累積現象則已消失，繼而，胚軸維管束組織周圍澱粉之累積量增加，而後由碘液之染色，判斷澱粉含量略有降低，但至浸潤後 24 天仍可偵測到澱粉累積於此一部位(圖一 A)，碘液染色僅能初步觀測種子內之澱粉分佈，因此利用酵素分析方式定量水稻種子於浸潤後 0 至 24 天之胚中澱粉含量，結果顯示澱粉在胚中於浸潤後開始累積，並在浸潤 12 天後達到高峰，而後澱粉含量些微降低(圖一 B)，且此結果亦和碘液染色之觀測相符，顯示碘液染色分析法於此可反應出胚中澱粉之累積量變化，且具有可觀測胚中澱粉分佈位置變化之優點，故後續研究將以碘染分析法進行胚中暫存系澱粉之生理意義及調控機制的探討。

### 2. 移除莖及葉組織及黑暗處理對胚軸澱粉累積之影響

為了進一步探討胚中澱粉之代謝是否受生長中器官對碳素之需求強度所調控，於是分別將幼苗生長時期主要之積儲組織莖及葉移除或藉由黑暗處理以降低葉部之光合作用效率，以進一步觀察其對胚中澱粉累積之影響。正常生長之水稻，其於浸潤 14 天後胚乳中幾乎已無澱粉存在，而胚中澱粉於浸潤 6 天後開始出現，並於浸潤 18 天後累積量達最多，而後含量略減(圖二 A)，如於胚軸澱粉累積初期(6 dai)即去除莖和葉組織，則胚乳澱粉降解速率明顯降低，其至浸潤 22 天後胚乳中澱粉仍未有明顯分解之現象；此外，雖在去除莖葉之水稻胚中，至浸潤 10 天後

胚中才有明顯澱粉累積之現象，但其後續之澱粉累積量卻明顯較正常生長植株高，且至浸潤22天後亦未有減少之趨勢(圖二B)。得知失去生長的積儲組織(growing sink tissue)後，雖然造成胚乳澱粉分解延緩，但胚中澱粉累積量則增加。

另一方面，經碘染觀測胚乳澱粉完全分解，且胚中澱粉仍然存在時(17 dai)，將水稻幼苗移至全黑暗環境中生長(之後簡稱為黑暗處理)，以使葉部光合作用效率降低，而後進一步分析在光合作用下降，葉部自營產生碳源能力下降的同時，是否會促進胚中所累積之碳素供給生長中的莖葉，並進而降低胚中澱粉之含量。結果顯示，正常生長之水稻植株於浸潤23天後胚中仍有澱粉之累積(圖三A)；但黑暗處理之植株，其胚中澱粉含量於黑暗處理後四天(21 dai)即明顯下降，而於處理後六天(23 dai)胚中即無觀測到澱粉之累積(圖三B)。綜合以上移除莖葉以降低其對碳源之需求或以黑暗處理增加莖葉組織對碳源之需求，可知胚中澱粉的累積及代謝由生長中莖及葉對碳素的需求所調控。

### 3. 黑暗處理對胚中水溶性糖類含量之影響

為了進一步確認上述黑暗處理下，是否可能葉部自營產生碳源能力下降並因此對碳源需求提高，而促進胚中之水溶性糖類加速運至葉部，進而造成胚中澱粉含量減少。於黑暗處理四天後(21 dai)，利用酵素分析法測定胚中水溶性糖類葡萄糖、果糖、蔗糖之含量變化。結果顯示，胚中水溶性糖類葡萄糖、果糖、蔗糖含量分別為正常生長植株之36%、40%、63%(圖四)，推測黑暗處理下胚中水溶性糖類因被運至莖葉組織而含量減少。另一方面，為了進一步確定黑暗處理下，是否胚中水溶性糖類含量為影響澱粉生合成相關酵素基因之表現的間接因子，因此進一步於黑暗處理同時在培養液中加入100 mM 葡萄糖，而胚中葡萄糖、果糖、蔗糖含量於處理四天後分別為正常生長植株之75%、23%、59%(圖四)，顯示在加了葡萄糖後，僅葡萄糖含量相較於黑暗處理植株有被提升之現象，而果糖和蔗糖含量則與黑暗處理植株無明顯差異。



#### 4. 黑暗處理對胚中澱粉合成酵素之基因表現之影響

為了釐清上述實驗中，經過黑暗處理後，胚中澱粉累積減少是因為莖葉組織對碳素的需求提高，而使胚內部澱粉分解速度增快，或是胚中澱粉合成速度減緩。於是分別分析黑暗處理對胚中澱粉合成酵素 granule-bound starch synthase (GBSS) 及 starch branching enzyme (SBE) 之基因表現之影響及澱粉分解酵素  $\alpha$ -amylase 之活性變化。於黑暗處理四天後(21 dai)，利用 real-time RT-PCR 的方式偵測胚中直鏈澱粉合成酶 GBSS 及支鏈澱粉合成酶 SBE 之基因表現，黑暗處理下胚中 *GBSSI, II* 為正常生長植株之 0.21; 0.15 倍，而 *SBEI III, IV* 則分別為 0.12; 0.40; 0.12 倍(圖五)，推測因澱粉合成相關酵素於黑暗處理下受到影響，而導致胚中澱粉含量下降。由澱粉分解酵素  $\alpha$ -amylase 在胚中的活性變化，顯示其於正常和黑暗處理 4 天後的植株間並無明顯差異(圖六)，推測  $\alpha$ -amylase 活性非調控胚中澱粉於黑暗處理下含量減少之關鍵因子。

由上述結果顯示黑暗處理後四天，胚中水溶性醣類葡萄糖、果糖及蔗糖含量皆較對照組低(圖四)，且 *GBSS* 及 *SBE* 之基因表現亦受到抑制(圖五)；為了進一步確定黑暗處理下，是否胚中水溶性醣類含量為影響澱粉生合成相關酵素基因之表現的間接因子，因此進一步於黑暗處理同時在培養液中加入 100 mM 葡萄糖，並觀測其對 *GBSS* 及 *SBE* 基因之表現影響。於黑暗處理同時給予植株 100 mM 葡萄糖 4 天後，胚中 *SBEIII* 表現被抑制的情況消失(圖五)，為正常生長植株之 0.77 倍，為黑暗處理植株之 2 倍；但 *GBSSI, II, SBEI, IV* 在黑暗處理及其同時加入 100 mM 葡萄糖之胚中的基因表現類似，其分別為正常生長植株之 0.4; 0.1; 0.1; 0.1 倍。

## 討論

### 1. 水稻種子發芽時胚乳澱粉水解及胚中澱粉之累積

Takahashi 等人(1962)之研究指出種子的吸水有一定途徑，其由胚乳及胚之交界進入，水分由胚盤上皮層進入胚，於種子浸潤後，胚盤上皮層細胞之  $\alpha$ -amylase 最先開始表現，並且此層具有吸收養分之功能(Murata, 1968; Thomas and Rodriguez, 1994)；推測種子發芽時胚乳中澱粉分解方向由靠近胚部分開始並擴展至糊粉層方向(圖一 B)為水解酵素之活化順序所造成。由胚乳運入胚之水溶性醣類部分被轉變為蔗糖以運至此時期之新生組織，或於胚延伸組織轉變為澱粉暫存於維管束組織周圍；於 Matsukura 等人(2000)及 Scofield 等人(2007)之研究皆指出水稻種子在浸潤後五天可於胚盤、胚軸維管束組織周圍有澱粉之累積，於本研究則進一步發現胚中澱粉累積部位隨植株生長而有轉移之現象，且胚盤中澱粉僅於種子發芽後累積短暫時間，並且同時可於胚軸發現少量澱粉之累積，而於胚軸澱粉累積時期則較長(圖一)。



### 2. 胚中澱粉累積之調控機制

於胚中所累積之澱粉累積初期即移除莖葉組織，雖然胚中澱粉累積有延緩上升之現象，但其後續之澱粉累積量卻明顯較正常生長植株高，且至浸潤 22 天後亦未有減少之趨勢(圖二 B)。推測胚乳運入之碳水化合物，因失去莖葉組織後，暫時累積於胚中，並且因其含量過多而轉變為澱粉而累積於此；並且，於 Matsukura 等人(2000)之研究指出，水稻分離胚於外加 100 mM 葡萄糖培養 30 小時後，胚中澱粉持續累積，且其含量較未加葡萄糖培養之對照組高，但胚中之水溶性醣類葡萄糖、果糖、蔗糖含量則於培養 30 小時前後無明顯差異，推測胚中澱粉可能具滲透壓調節之功能，而於外加醣類或是去除莖葉組織後，運至胚中之醣類因滲透壓之關係而轉變為澱粉累積於胚中。

於黑暗處理後胚中水溶性醣類葡萄糖、果糖及蔗糖含量皆較對照組植株低(圖

四)，並且澱粉合成酵素 *GBSS* 及 *SBE* 基因表現受到抑制，於 Dian 等人(2003) 及 Zhou 等人(2006)所發表之研究分別指出水稻 *OsGBSSI, II* 之表現會受到外加葡萄糖、蔗糖調控；因此進一步於黑暗處理植株同時外加 100 mM 葡萄糖培養；但胚中僅葡萄糖含量改變而果糖及蔗糖則未受到影響(圖四)，由 Pathre 等人(2004)所發表研究指出 Swartz(一種菊科之植物)葉中之蔗糖磷酸合成酶(sucrose phosphate synthase)於夜晚時活性較低，且此一時期水稻胚中蔗糖磷酸合成酶活性較低(Nomura et al., 1969)，推測黑暗處理之水稻胚中蔗糖合成亦受到影響。於黑暗處理同時外加 100 mM 葡萄糖於培養液中，僅有 *SBEIII* 於原本黑暗處理抑制其基因表現之現象消失，顯示葡萄糖可能為黑暗處理時調控 *SBEIII* 基因表現之間接因子，於黑暗處理並外加葡萄糖後 *GBSSI, II* 及 *SBEI, IV* 之表現無明顯之差異，顯示葡萄糖含量非直接調控其基因表現之直接因子。於 Han 等人(2007)之研究指出利用 *OsSBEIII* 之 cDNA 序列比對水稻 expressed sequence tag (EST) 資料庫，推測 *OsSBEIII* 可能於葉部、花或莖及種子中皆有表現，亦即其於供源或積儲組織中皆可能存在，因此仍須進一步實驗方可確定其是否可能為胚中暫存性澱粉生合成之關鍵調控基因之一。

於 Dian 等人(2003)及 Li 等人(2006)所發表研究指出將水稻植株移到弱光下栽植，會造成穀粒或葉中 *GBSS* 酵素活性下降，推測此處觀察到黑暗處理下胚中 *GBSS* 或 *SBE* 之基因表現受到抑制，可能同時其酵素活性亦會受到影響；而於 Wang 等人(2001)所發表研究則指出甘藷 *GBSSI* 表現會受到光照誘導，然而，其亦指出光照主要透由光合作用產物-蔗糖，而進一步影響 *GBSSI* 之表現；並且，目前已知 *GBSSI, II* 之基因表現亦會受 ABA 等植物荷爾蒙之影響(Wang et al., 2006)。因此，推測黑暗處理後，胚中 *GBSSI, II* 之基因表現受到抑制可能包含了其他水溶性醣類如蔗糖含量及植物荷爾蒙如 ABA 之交互作用所共同調控。於 Li 等人(2006)所發表之研究指出，水稻開花後給予遮蔽光照，穀粒中之 *SBE* 活性反而會較高，然而在連續黑暗處理 4 天後會抑制 *SBE* 之基因表現，顯示 *SBE* 之表現於短時間或長時間黑暗或

弱光處理間可能會有不同反應。關於黑暗處理下對 *GBSSI, II* 或 *SBEI, IV* 之調控機制則需進一步之實驗證明。

### 3. 胚延伸組織暫存性澱粉之生理意義探討

水稻種子發芽時，胚乳澱粉分解並生成水溶性醣類而運入胚中，大部分水溶性醣類可進一步合成蔗糖以透由維管束組織運至此時期之新生組織，而部分醣類則會再次合成澱粉暫存於胚中；種子發芽後，胚中澱粉短暫於胚盤部位累積，此一澱粉累積部位隨植株生長而主要累積部位由胚盤轉移至胚軸。胚中暫存性澱粉之生合成代謝主要由此一時期生長中的莖葉組織對於碳素的需求強度調控，其可能於胚中碳水化合物滲透壓調節扮演重要角色。並且，由黑暗處理後胚中澱粉代謝酵素  $\alpha$ -amylase 之活性並未受到影響，而澱粉合成酵素 *granule-bound starch synthase (GBSS) I, II* 及 *starch branching enzyme(SBE) I, II, IV* 基因表現受到抑制，推測澱粉合成酵素扮演黑暗處理時胚中澱粉代謝之關鍵調控角色，並由黑暗處理及其同時加入葡萄糖後，偵測胚中葡萄糖、果糖、蔗糖含量變化，推測水溶性醣類含量變化或其他因子如植物荷爾蒙為影響胚中澱粉之代謝之間接因子(圖七)。

## 參考文獻

- Aoki N, Scofield GN, Wang XD, Offler CE, Patrick JW, Furbank RT** (2006) Pathway of sugar transport in germinating wheat seeds. *Plant Physiol* 141: 1255-1263
- Akihiro T, Mizuno K, Fujimura T** (1977) Gene expression of ADP-glucose pyrophosphorylase and starch contents in rice cultured cells are cooperatively regulated by sucrose and ABA. *Plant Physiol* 60: 305-308
- Asatsuma S, Sawada C, Itoh K, Okito M, Kitajima A, Mitsui T** (2005) Involvement of  $\alpha$ -amylase I-1 in starch degradation in rice chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 46:858-869
- Beck E, Ziegler P** (1989) Biosynthesis and degradation of Starch in higher plants. *Plant Mol Biol* 40: 95-117
- Bewley JD, Black M** (1994) *Seeds. Physiology of development and germination* (2nd edition). Plenum Press, New York
- Bradford M** (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
- Brown HT, Morris GH** (1890) Researches on the germinating of some of the Gramineae part I. *Chem Soc J* 57:458-528
- 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
- Campbell JA, Hansen RW, Wilson JR** (1999) Cost-effective colorimetric microtitre plate enzymatic assays for sucrose, glucose and fructose in sugarcane tissue extracts. *J Sci Food Agri* 79: 232-236
- Chen XH, Liu QQ, Wu HK, Wang ZY, Gu MH** (2004) cDNA cloning and sequence analysis of rice *sbe1* and *sbe3* genes. *Rice Sci* 11: 81-85
- Chen JY** (2006) Regulation of sucrose transporter genes in rice embryos during seed germination. Master Thesis. Department of Agronomy, College of Bioresources and Agriculture, National Taiwan University
- Chen HJ, Chen JY, Wang SJ** (2008) Molecular regulation of starch accumulation in rice seedling leaves in response to salt stress. *Acta Physiol Plant* 30: 135-142
- Denyer K, Barber LM, Edwards EA, Smith AM, Wang TL** (1997) Two isoforms of the GBSSI class of granule-bound starch synthase are differentially expressed in the pea plant (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell Environ* 20: 1566-1572
- Dian WM, Jiang HW, Chen Q, Liu F, 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. *J Exp Bot* 56: 623-632.
- Peavey DG, Steup M, Gibbs M** (1977) Characterization of starch breakdown in the intact spinach chloroplast. *Plant Physiol* 60: 305-308
- Edelman J, Shibko SI, Keys AJ** (1959) The roles of the scutellum of cereal seedlings in the synthesis and transport of sucrose. *J Exp Bot* 10: 179-189
- Han Y, Sun FJ, Mendoza SR, Korban SS** (2007) Three orthologs in rice, *Arabidopsis*, and *Populus* encoding starch branching enzymes (SBEs) are different from other *SBE* gene families in plants. *Gene* 401: 123-130
- Hirose T, Terao T** (2004) A comprehensive expression analysis of the starch synthase gene family in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta* 220:9-16
- Huang N, Stebbins GL, Rodriguez RL** (1992) Classification and evolution of alpha-amylase genes in plants. *PNAS* 89: 7526-7530
- 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
- James AL** (1940) The carbohydrate metabolism of germinating barley. *New Phytol* 39:133-144
- James MG, Denyerz K, Myers AM** (2003) Starch synthesis in the cereal endosperm. *Curr Opin Plant Biol* 6:215-222
- Kaneko M, Itoh H, Ueguchi TM, Ashikari M, Matsuoka M** (2002) The  $\alpha$ -amylase induction in endosperm during rice seed germination is caused by gibberellin synthesized in epithelium. *Plant Physiol* 128: 1264-1270
- Kim JK, Cao J, Wu R** (1992) Regulation and interaction of multiple protein factors with the proximal promoter regions of a rice high pl  $\alpha$ -amylase gene. *Mol General Genetics* 232: 383-393
- La Cognata U, Willmitzer L, Müller-Röber B** (1995) Molecular cloning and characterization of novel isoforms of potato ADP-glucose pyrophosphorylase. *Mol Gen Genet* 246:538-548
- Levi C, Gibbs M** (1976) Starch degradation in isolated spinach chloroplasts. *Plant Physiol* 57:933-935
- Li T, Ryu O, Tohru Y, Haruto S** (2006) Effects of weak light on starch accumulation and starch synthesis enzyme activities in rice at the grain filling stage. *Rice Sci* 13: 51-58
- Loreti E, Bellis LD, Alpi A, Perata P** (2001) Why and how do plant cells sense sugars? *Ann Bot* 88:803-812

- Lu Y, Sharkey TD** (2004) The role of amylomaltase in maltose metabolism in the cytosol of photosynthetic cells. *Planta* 218:466–473
- Lu Y, Gehan JP, Sharkey TD** (2005) Daylength and circadian effects on starch degradation and maltose metabolism. *Plant Physiol* 138:2280–2291
- Lu Y, Sharkey TD** (2006) The importance of maltose in transitory starch breakdown. *Plant Cell Environ* 29:353–366
- Lu Y, Steichen JM, Weise SE, Sharkey TD** (2006) Cellular and organ level localization of maltose in maltose-excess *Arabidopsis* mutants. *Planta* 224:935–943
- Marshall J, Sidebottom C, Debet M, Martin C, Smith AM, Edwards A** (1996) Identification of the major starch synthase in the soluble fraction of potato tubers. *Plant Cell* 8: 112-1135
- Matsukura CA, 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
- Matsuo T, Hoshikawa K** (1993) Science of the rice plants. Food and Agriculture Policy Research Center. (<http://www.ruralnet.or.jp/E/srp/index.html>)
- Mitchell WJ** (1998) Physiology of carbohydrate to solvent conversion by clostridia. *Adv Microbial Physiol* 39: 31-130
- Mitsuia T, Itoh The K** (1997)  $\alpha$ -amylase multigene family. *Trends in Plant Science* 2: 255-261
- Möhlmann T, Tjaden J, Henrichs G, Quick WP, Häusler R, Neuhaus HE** (1997) ADP-glucose drives starch synthesis in isolated maize endosperm amyloplasts : characterization of starch synthesis and transport properties across the amyloplast envelope. *Biochem J* 324: 503-509
- Murata T** (1968) Enzymic mechanism of starch breakdown in germinating rice seeds I. An analytical study. *Plant Physiol* 43:1899-1905
- Mutisya J, Sun C, Jansson C** (2009) Circadian oscillation of starch branching enzyme gene expression in the sorghum endosperm. *J Plant Physiol* 166: 428-434
- Nakamura Y, Yamanouchi H** (1992) Nucleotide sequence of a cDNA encoding starch-branching enzyme, or Q-enzyme I, from rice endosperm. *Plant Physiol* 99: 1265-1266
- Nakamura T, Vrinten P, Hayakawa K, Ikeda J** (1998) Characterization of a granule-bound starch synthase isoform found in the pericarp of wheat. *Plant Physiol* 118: 451-459
- Niittylä T, Messerli G, Trevisan M, Chen J, Smith AM, Zeeman SC** (2004) A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in

leaves. Science 303:87-89

- Nomura T, Konol Y, Akazawa T** (1969) Enzymic mechanism of starch breakdown in germinating rice seeds II. Scutellum as the site of sucrose synthesis. Plant Physiol 44:765-769
- Pathre UV, Sinha AK, Shirke PA, Ranade SA** (2004) Diurnal and seasonal modulation of sucrose phosphate synthase activity in leaves of *Prosopis juliflora*. Bio Plant 48: 227-235
- Peavey DG, Steup M, Gibbs M** (1977) Characterization of starch breakdown in the intact spinach chloroplast. Plant Physiol 60: 305-308
- Reimann R** (2003) Mechanisms of starch degradation in turions of *Spirodela polyrhiza*. Faculty of Biology and Pharmaceutics, Institute of General Botany/Plant Physiology Friedrich-Schiller University Jena
- Ritte G, Scharf A, Eckermann N, Haebel S, Steup M** (2004) Phosphorylation of transitory starch is increased during degradation. Plant Physiol 135:2068–2077
- Scofield GN, Aoki N, Hirose T, Takano M, Jenkins CLD, 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
- Shinke R** (1988) Plant  $\alpha$ -amylase. In: Handbook of amylases and related enzymes. edited by the Amylase Research Society of Japan. pp. 26-32. Pergamon Press, Oxford
- Smith AM, Denyer K, Martin C** (1997) The synthesis of the starch granule. Annu Rev Plant Physiol 48:67-87
- Smith AM, Zeeman SC, Smith SM** (2005) Starch degradation. Annu Rev Plant Biol 56:73–98
- Smith AM, Zeeman SC** (2006) Quantification of starch in plant tissues. Nature Protocols 1: 1342-1344
- Spackman VMT, Cobb AH** (2001) An enzyme-based method for the rapid determination of sucrose, glucose and fructose in sugar beet roots and the effects of impact damage and postharvest storage in clamps. J Sci Food Agric 82: 80-86
- Steup M, Robenel H, Melkonian M** (1983) In-vitro degradation of starch granules isolated from spinach chloroplasts. Planta 158:428-436
- Sun Z, Duke SH, Henson CA** (1995) The role of pea chloroplast  $\alpha$ -glucosidase in transitory starch degradation. Plant Physiol 108:211-217
- Takahashi N** (1962) Physiocogenetical studies on germination of rice seeds with special reference to its genetical factors. Bull Inst Agric Res Tohoku Univ
- Thomas B, Rodriguez R** (1994) Metabolite signals regulate gene expression and source/sink relations in cereal seedlings. Plant Physiol 106: 1235-1239
- Toyofuku K, Umemura T, Yamaguchi J** (1998) Promoter elements required for



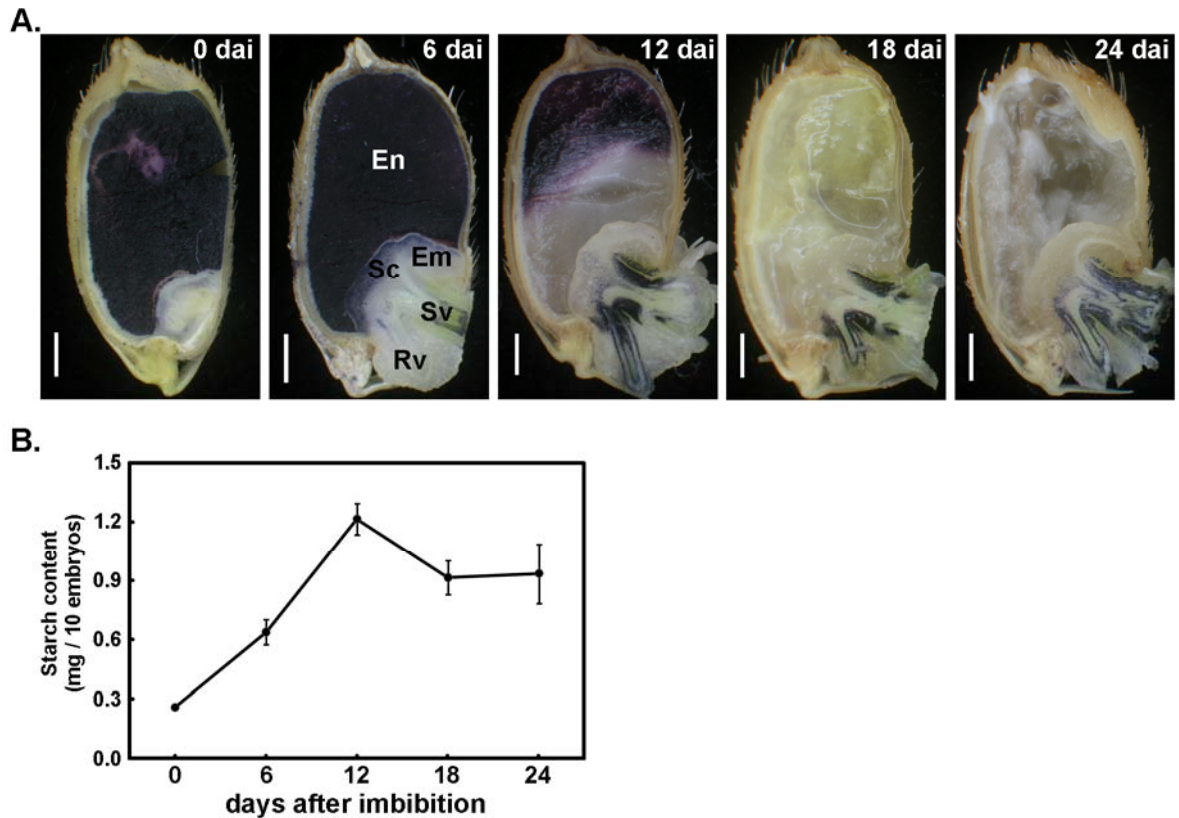
- sugar-repression of the RAmy3D gene for  $\alpha$ -amylase in rice. FEBS Lett 428 :275-280
- Tsai CY** (1974) The function of the Waxy locus in starch synthesis in maize endosperm. Biochem Genet 11: 83-96
- Viola R, Davies HV** (1992) A microplate reader assay for rapid enzymatic quantification of sugars in potato tubers. Potato Res 35: 55-58
- 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 SJ, Yeh KW, Tsai CY** (1999) Molecular characterization and expression of a starch granule-bound starch synthase gene in the sink and source tissues of sweet potato. Physiol Plant 106:253-261.
- 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. Bio Plant 50: 537-541
- Watanade 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
- Webber H, Heim U, Borisjuk L, Wobus U** (1995) Cell-type specific, coordinate expression of two ADP-glucose pyrophosphorylase genes in relation to starch biosynthesis during seed development of *Vicia faba L.* Planta 195:352-361
- Weise SE, Weber APM, Sharkey TD** (2004) Maltose is the major form of carbon exported from the chloroplast at night. Planta 218:474-482
- Weise SE, Kim KS, Stewart RP, Sharkey TD** (2005)  $\beta$ -Maltose is the metabolically active anomer of maltose during transitory starch degradation. Plant Physiol 137, 756-761
- Weise SE, Schrader SM, Kleinbeck KR, Sharkey TD** (2006) Carbon balance and circadian regulation of hydrolytic and phosphorolytic breakdown of transitory starch. Plant Physiol 141:879-886
- Williams JF, Peterson ML** (1973) Relations between alpha-amylase activity and growth of rice seedlings. Crop Sci 13: 612-615
- Yu SM, Lee YC, Fang SC, Chan MT, Hwa SF, Liu LF** (2004) Sugars act as signal molecules and osmotica to regulate the expression of  $\alpha$ -amylase genes and metabolic activities in germinating cereal grains. Plant Mol Biol 20: 1277-1289
- Yu TS, Zeeman SC, Thorneycroft D, Fulton DC, Dunstan H, Lue WL, Hegemann**

**B, Tung SY, Umemoto T, Chapple A, Tsai DL, Wang SM, Smith AM, Chen J, Smith SM** (2005)  $\alpha$ -Amylase is not required for breakdown of transitory starch in *Arabidopsis* leaves J Biol Chem 280:9773-9779

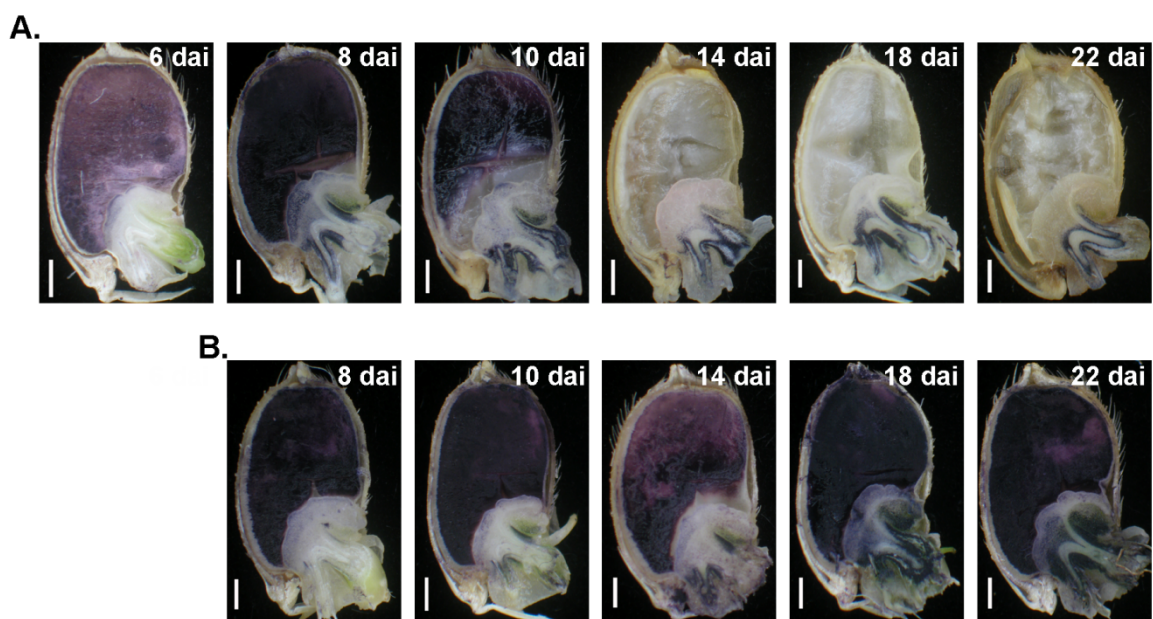
**Yung CT** (1938) Developmental anatomy of the seedling of the rice plant. Bot Gaz 99: 786-802

**Zhou Q, Jiang D, Dai T, Jing Q, Cao W** (2006) Regulation of starch and protein synthesis in wheat grains by feeding sucrose and glutamine to detached ears cultured *in vitro*. Plant Growth Regul 48: 247-259

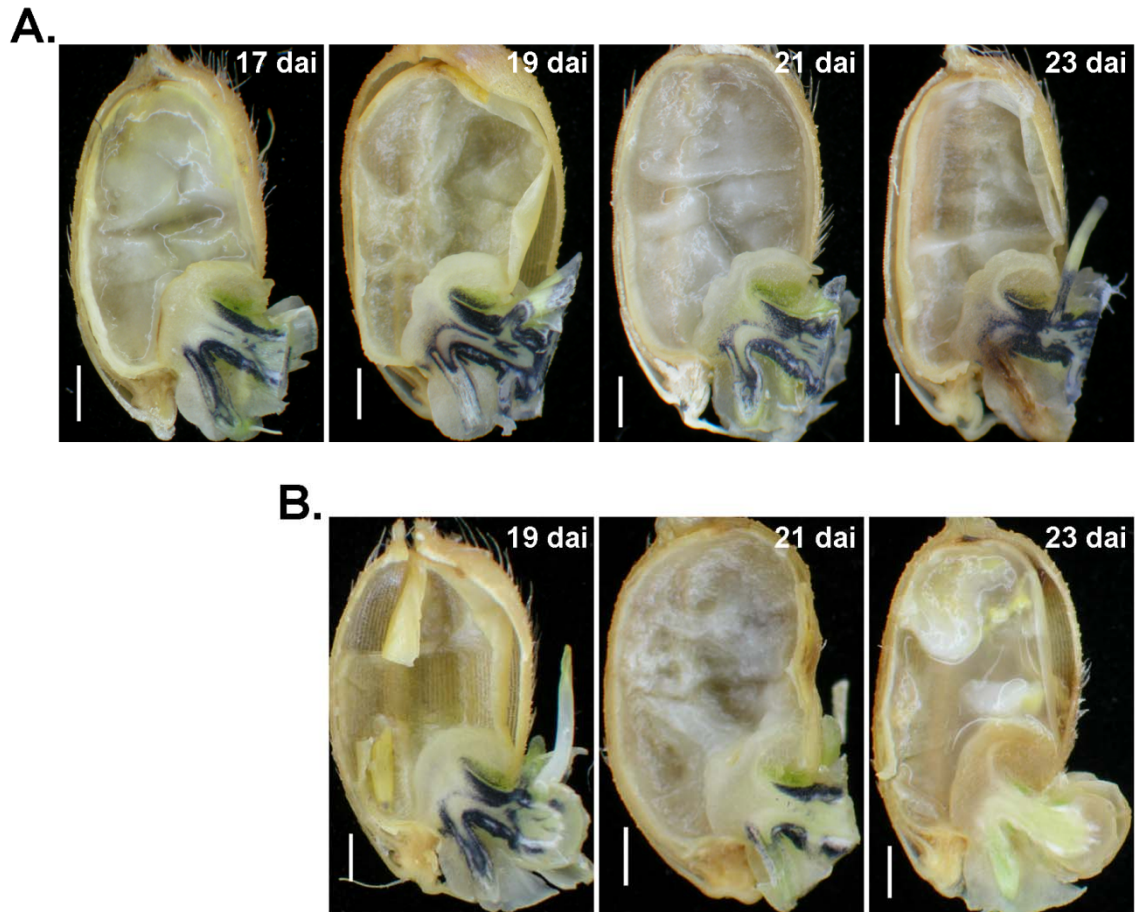




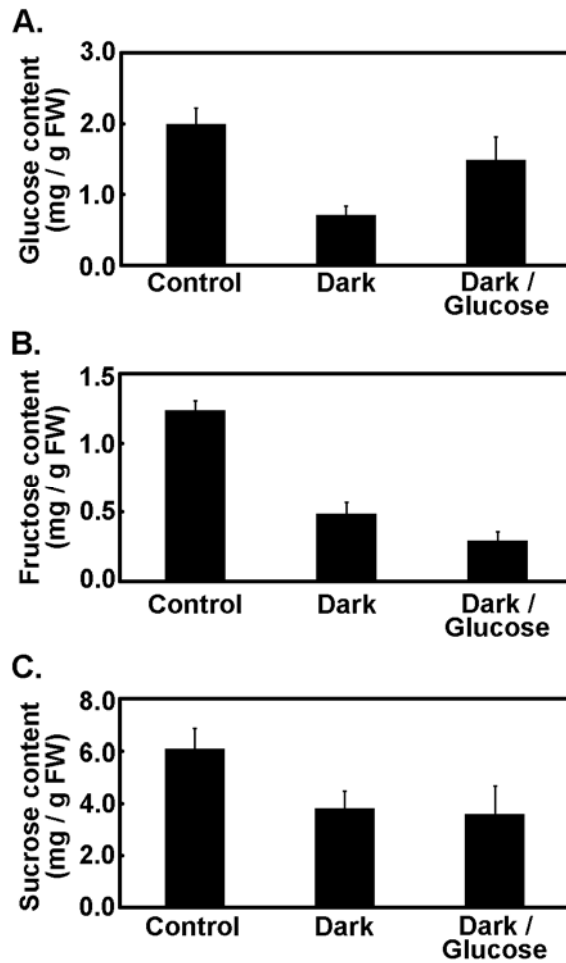
圖一、水稻幼苗生長初期胚及種子內之澱粉累積及胚中澱粉含量變化。A.利用碘染觀測水稻種子在乾燥(0 dai)、浸潤後 6, 12, 18, 24 天的澱粉之分佈情形，每個樣品皆由 10-20 個水稻種子組成，進行樣品內澱粉累積情況比較後，取其中佔多數比例之一樣品為代表。B.利用酵素反應之方式測定水稻幼苗胚部位在乾燥(0 dai)、浸潤後 6, 12, 18, 24 天的澱粉含量變化。dai, days after imbibitions (浸潤後); En, endosperm (胚乳); Em, embryo (胚); Sc, scutellum (胚盤); Sv, shoot vascular bundle; Rv, root vascular bundle, scale bar=1mm。



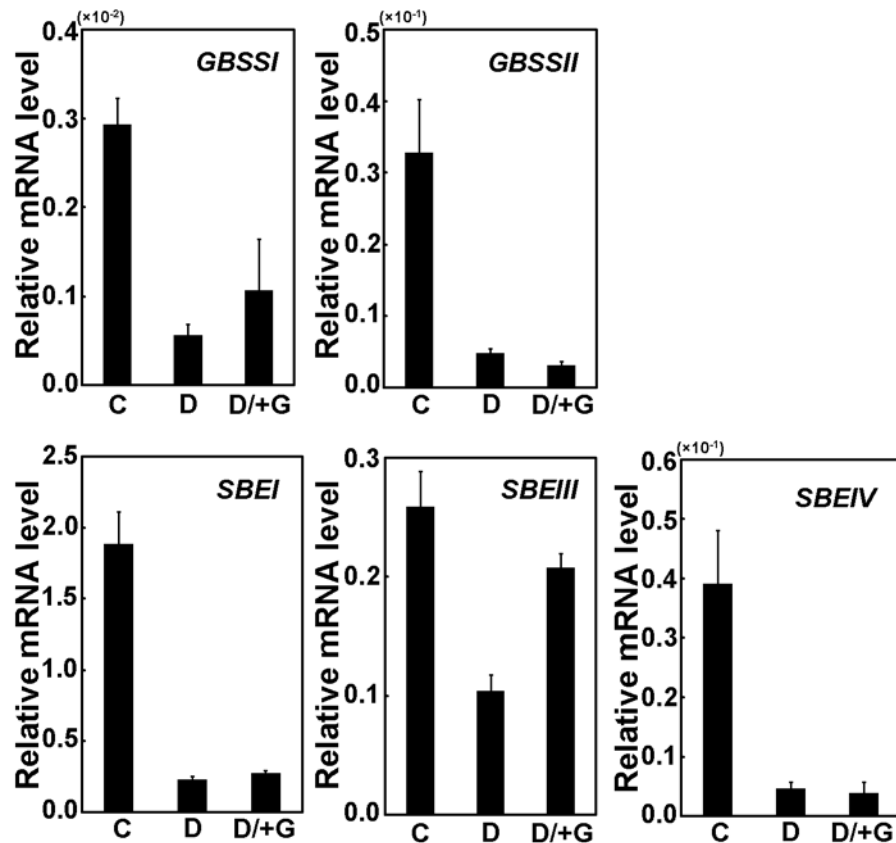
圖二、去除莖及葉組織對胚中暫存性澱粉累積之影響。A.水稻種子分別在浸潤後 6, 8, 10, 14, 18, 22 天的澱粉累積情形。B.於浸潤後 6 天去除胚延伸組織，再經過 2, 4, 8, 12, 16 天的澱粉累積情形。每個樣品皆由 10-20 個水稻種子組成，進行樣品內澱粉累積情況比較後，取其中佔多數比例之一樣品為代表。dai, days after imbibitions(浸潤後)，scale bar=1mm。



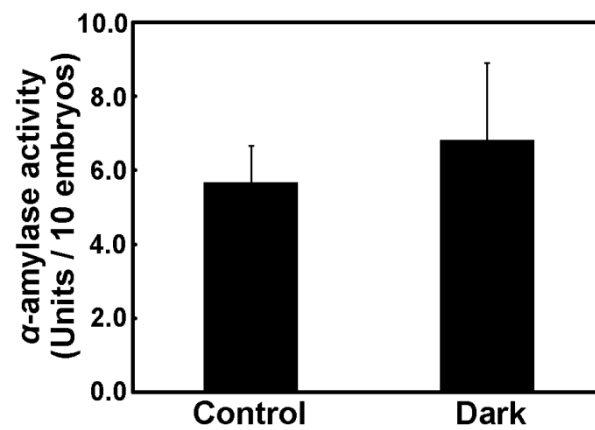
圖三、黑暗處理對胚中暫存性澱粉累積之影響。A.水稻種子分別於浸潤後 17, 19, 21, 23 天的澱粉累積情形。B.於浸潤後 17 天將水稻移入全黑暗中，再經過 2, 4, 6 天後的澱粉累積情形。每個樣品皆由 10-20 個水稻種子樣品組成，進行樣品內澱粉累積情況比較後，取其中佔多數比例之一樣品為代表。dai, days after imbibitions(浸潤後)，scale bar=1mm。



圖四、黑暗處理對胚中水溶性醣類含量之影響。水稻種子浸潤後 17 天移入全黑暗環境或是黑暗處理同時外加 100 mM 葡萄糖，再經過 4 天後觀察胚中 A. 葡萄糖(glucose)，B. 果糖(fructose)及 C. 蔗糖(sucrose)含量變化。每個重複由 10 個水稻胚組成，結果為三重複的平均值，誤差值以 standard error(S.E.)表示。

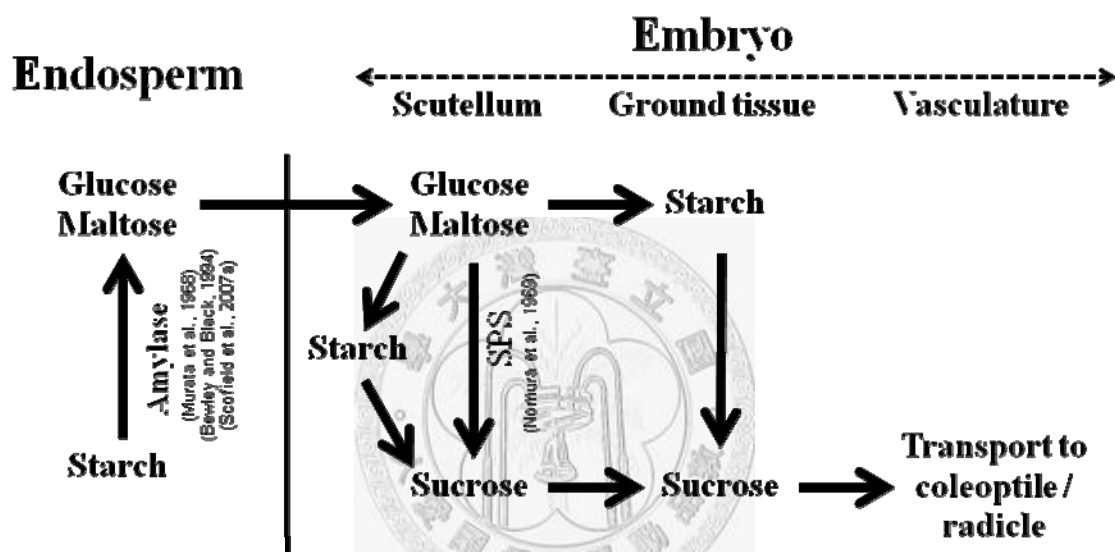


圖五、黑暗處理對胚中澱粉合成酵素 GBSS, SBE 之基因表現的影響。水稻種子浸潤後 17 天移入全黑暗環境或是黑暗處理同時外加 100 mM 葡萄糖, 再經過 4 天後觀察水稻胚中 *OsGBSSI*、*OsGBSSII*、*OsSBEI*、*OsSBEIII*、*OsSBEIV* 基因之表現。C, Control; D, Dark; D/+G, 黑暗處理同時外加 100 mM 葡萄糖。每個重複由 10 個水稻胚組成, 結果為三重複的平均值, 誤差值以 standard error(S.E.)表示。GBSS, granule-bound starch synthase; SBE, starch branch enzyme。



圖六、黑暗處理對於水稻胚中澱粉水解酵素  $\alpha$ -amylase 活性的影響。水稻種子於浸潤後 17 天移入全黑暗環境，再經過 4 天後進行胚中  $\alpha$ -amylase 活性之測定。每個重複由 10 個水稻胚部位組成，所有樣品進行四重複處理，誤差值以 standard error(S.E.)表示。





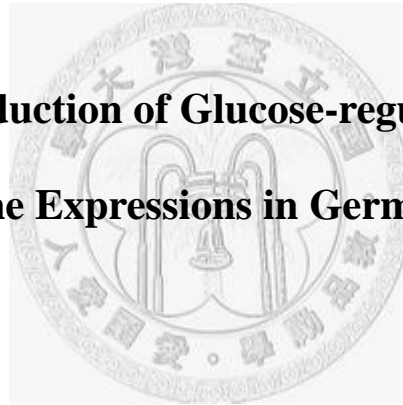
圖七、水稻幼苗生長時期碳水化合物由胚乳運至胚及新生組織之過程示意圖。水稻幼苗生長時期主要碳水化合物來源為胚乳中澱粉水解為葡萄糖及麥芽糖並透由胚盤運至胚中；在胚中，部分葡萄糖及麥芽糖會直接轉變為以蔗糖形式透由維管束組織運至新生組織，另外一部份則會轉變為以澱粉形式暫時儲存在胚中，於種子發芽初期胚中澱粉主要於胚盤部位出現，之後其主要累積部位則轉移至胚軸維管束組織周圍。GBSS, granule-bound starch synthase; SBE, starch branch enzyme; SPS, Sucrose phosphate synthase。

## 第二部份

水稻種子發芽時期葡萄糖影響胚中蔗糖轉運蛋白基因表現之

訊息傳導途徑

**Signal Transduction of Glucose-regulated Sucrose  
Transporter Gene Expressions in Germinating Embryos**



## 中文摘要

蔗糖轉運蛋白(sucrose transporter; SUT)為負責運輸蔗糖進行跨膜運輸之轉運蛋白，經由水稻基因組序列分析，目前已知水稻具有五個SUT基因，分別命名為*OsSUT1, 2, 3, 4, 5*。本研究之目的為探討葡萄糖分子對水稻胚發芽時，胚中*OsSUT1*及*OsSUT2*基因表現之影響及其調控機制，首先藉由水稻分離胚培養之實驗，發現於培養液中加入葡萄糖，其於短時間(一天)培養後，*OsSUT1*之基因表現會被抑制，但在長時間(五天)於含葡萄糖之培養液中培養的胚組織中，*OsSUT1*之表現則會明顯的升高，由乾燥或是浸潤後四天之水稻胚處理葡萄糖一天後*OsSUT1*表現皆會受到抑制，得知此葡萄糖短時間與長時間效應對於*OsSUT1*之不同影響主要為葡萄糖處理時間長短所造成；另一方面，外加葡萄糖於培養液中，不論於短時間或長時間培養皆會促進*OsSUT2*表現，且其促進之效果隨培養時間增長而更為明顯。藉由葡萄糖衍生物 3-O-Methylglucose 以及六碳糖激酶(hexokinase)抑制物 N-acetyl glucosamine 對胚中*SUT1, 2*之影響得知葡萄糖對於*OsSUT1*基因之表現調控，不論於短時間或長時間之影響皆為Hexokinase-dependent pathway，而對*OsSUT2*基因之表現調控則為Hexokinase-independent pathway。

## Abstract

Sucrose transporters are transmembrane proteins in charge of transporting sucrose across cell membrane. There are five sucrose transporter isogenes in rice (*Oryza sativa* L.) and named *OsSUT1*, 2, 3, 4, 5. During embryo germination, effect of glucose on *OsSUT1* expression in embryos presented a bi-phase process. *OsSUT1* expression was repressed in embryos when germinated in glucose-containing medium after 1-d treatment; however, it was enhanced after 5-d treatment. It was proposed that the differential effects of glucose on *OsSUT1* expression were mainly affected by glucose treatment period. Besides, *OsSUT2* expression was enhanced in embryos when germinated in glucose-containing medium after 1 and 5-d treatment. According to the effects of sugar analog, 3-*O*-Methylglucose, and hexokinase inhibitor, N-acetyl glucosamine, on *OsSUT1* expressions, it was suggested that the signal transduction for regulating glucose-responsive *OsSUT1* expressions in embryos were mediated by hexokinase-dependent pathway. On the other hand, glucose affected *OsSUT2* expression was through a hexokinase-independent.

## 前言

### 1. 蔗糖轉運蛋白之生理功能及其分類

蔗糖(sucrose)為高等植物碳水化合物運輸之主要形式，植物於供源組織(source tissue)將碳素轉變為蔗糖之形式，之後藉由共質體傳輸路徑(symplastic pathway)或經由蔗糖轉運蛋白(sucrose transporter, SUT)將蔗糖運載入維管束組織，並以蔗糖形式進行長距離運輸至積儲組織(sink tissue)，以供給其所需要之碳素。藉由胺基酸序列分析結果，顯示 SUT 之蛋白由 12 個跨膜區(transmembrane domains)組成一通道以供蔗糖通過膜，並且其胺基酸序列 N 端及 C 端皆位於細胞質內；目前已知 SUT 皆為耗能之蔗糖/氫離子(1:1)同向轉運蛋白(sucrose- $H^+$  symporter)，而其運輸能量來源為膜上  $H^+$ -ATPase 造成之質子濃度梯度差(Bush, 1993; Dewitt and Sussman, 1995)，於 Carpaneto 等人(2005)之研究利用 patch clamp 方式，發現 SUT 的運輸方向依蔗糖梯度、pH 值或細胞膜電位勢而不同；並且於波菜或小麥之研究知道 SUT 亦可輸送葡萄糖(glucose)、麥芽糖(maltose)等醣類，但運輸效率較低(Riesmeier et al., 1992; Aoki et al., 2006; Sivitz et al., 2007)。

由序列以及功能性分析，植物 SUT 最早被分為三個 Type，Type I 僅發現於雙子葉植物中，其為 high-affinity(139  $\mu$ M-1.5 mM) / low capacity 之轉運蛋白，Type III 於單及雙子葉植物中都有發現，此一類 SUT 為 low-affinity(5 mM-6 mM)/ high capacity 之轉運蛋白。而 Type II 雖然均存在於單、雙子葉植物中，但僅知其內有一小群具較長之 N 端胺基酸序列，並具有位於細胞質之中心環圈(central loop)序列(Aoki et al., 2003; Lalonde et al., 2004; Sauer, 2007; Braun et al., 2009)；隨著關於蔗糖轉運蛋白之研究增加，於 Braun 等人(2009)之研究重新將 SUT 分為五個 Group，並重新編號，原本之 Type I 為 Group II，僅於單子葉植物發現(如 HvSUT1, OsSUT1, 3, ShSUT1, TaSUT1, ZmSUT1, 3)；Type III 為 Group IV，而 Type II 之 SUT 則進一步分為 Group I, III, V 三個群組。

Group I 之水稻 OsSUT1 為最早被發現的單子葉植物 SUT，目前為止對其於植

物生理上之意義亦較清楚，由 RT-PCR 之方法得知其於發芽種子、供源葉鞘(source leaf sheath)、穗(panicle)表現量較高，而在根則較低(Aoki et al., 2003)。OsSUT1 分別於種子發芽及穀粒充實皆具有重要功能，利用 antisense suppression 的方法降低 OsSUT1 之含量導致水稻種子發芽率降低及幼苗生長延緩(Scofield et al., 2002)。而由含 OsSUT1 啟動子(promoter)驅動  $\beta$ -glucuronidase (GUS)的轉植株及利用原位雜交(in situ hybridization)和免疫反應(immunolocalization)的方式得知水稻幼苗 OsSUT1 基因主要表現於胚及幼葉之維管束組織，且其蛋白於篩管中被發現(Matsukura et al., 2000; Scofield et al., 2007a)。推測其在種子發芽時，負責將胚中蔗糖運載入維管束組織，以利蔗糖能順利運輸至積儲組織(Matsukura et al., 2000; Scofield et al., 2007a)。於成株水稻中，利用 RT-PCR 之方法知道 OsSUT1 於穎果內之表現約在開花後 5-10 天上升而後逐漸下降(Furbank et al., 2001; Aoki et al., 2003)，藉由含 OsSUT1 啟動子驅動 GUS 的轉植株及利用免疫反應的方式，發現抽穗前 OsSUT1 之基因和蛋白主要表現於篩管及伴細胞中，而於種子發育時則存在於劍葉葉鞘至種子之篩管、珠心內，推測 OsSUT1 可能於水稻種子充實時，於葉部進行蔗糖裝載至維管束中及於穗中進行蔗糖之卸載 (Furbank et al., 2001; Scofield et al., 2007b)。但由 antisense suppression 的方法降低 OsSUT1 之 RNA 或是蛋白含量卻不對轉植株之葉部光合作用效率或是葉部碳水化合物含量造成影響，而僅對種子充實造成影響；推測於種子發育時，OsSUT1 可能主要在種子內蔗糖卸載上扮演較重要角色(Ishimaru et al., 2001; Scofield et al., 2002)，但在葉中之蔗糖的運載則可能有其他蔗糖轉運蛋白或酵素可取代。而水稻 OsSUT3 在積儲葉中表現較高，發芽種子中表現量則最低(Aoki et al., 2003)。小麥(*Triticum aestivum*)TaSUT1 於種子發芽時，基因及蛋白表現於胚盤表層、基本組織、胚維管束組織，推測其於種子發芽時，負責將胚乳澱粉分解生成之醣類運入胚中並於胚中將醣類運載至維管束組織(Aoki et al., 2006)。而甘蔗(*Saccharum officinarum*) ShSUT1 可能於維管束及莖節組織間碳分配扮演重要角色(Rae et al., 2005)。

Group II 之 SUT 僅於雙子葉植物中發現(如 *AtSUC1,2,5,9*, *LeSUT1*, *NtSUT1*, *StSUT1*)。T-DNA 插入之阿拉伯芥(*Arabidopsis thaliana*) *AtSUC2* 突變株產生植株生長遲緩、植株黃化提早死亡及開花延遲等現象，且突變株葉綠體中積存大量澱粉，而 *AtSUC2* 基因和蛋白主要表現於韌皮部組織伴細胞中，推測其於葉部組織之碳素運輸扮演重要角色(Truernit and Sauer, 1995; Stadler and Sauer, 1996; Gottwald et al., 2000; Wright et al., 2003; Schneidereit et al., 2008)。而於馬鈴薯(*Solanum tuberosum*)(Riesmeier et al., 1994)、菸草(*Nicotiana tabacum*)(Bürkle et al., 1998)、及蕃茄(*Solanum lycopersicum*)(Hackel et al., 2006)中皆有利用 antisense suppression 的方法降低其蔗糖轉運蛋白基因表現的研究，並發現轉植株的葉片碳水化合物運輸皆受阻，並進而對植株生長造成影響，推測此一群組之蔗糖轉運蛋白於葉部碳水化合物運輸具重要功能。

Group III 之 SUT 則同時於單及雙子葉植物中存在(*AtSUC3*, *LeSUT2*, *OsSUT4*, *ZmSUT4*)，已知 *OsSUT4* 在供源葉部表現量較高(Aoki et al., 2003)，其和 Group II 之 SUT 結構較為類似，皆具較長的 N 端胺基酸序列和可能位於細胞質的中間序列，屬於阿拉伯芥 *AtSUC3*、蕃茄 *LeSUT2* 的 orthologue (Lim et al., 2006)。阿拉伯芥 *AtSUC3* 於全株皆有表現，雖有研究認為其可能為蔗糖訊息接收者(signal receptor)，但 *AtSUC3* 突變株卻無明顯外表和野生型不同處，故仍不知其詳細功能為何(Barker et al., 2000; Barth et al., 2003; Meyer et al. 2000, 2004)。

Group IV 之 SUT 亦同時於單及雙子葉植物中皆存在(*AtSUT4*, *HvSUT2*, *LjSUT4*, *OsSUT2*, *StSUT4*, *ZmSUT2*)，Aoki 等人(2003)藉由 RT-PCR 之方法，知道 *OsSUT2* 於所有組織中表現量一致(發芽種子、根、供源和積儲葉身及葉鞘以及穗)，並且在開花初期發育中的穎果表現較高，並且目前已知阿拉伯芥 *AtSUT4*、大麥(*Hordeum vulgare*)之 *HvSUT2* 及百脈根(*Lotus japonicus*)之 *LjSUT4* 皆表現於液胞膜上，推測其可能於細胞質及液胞間醣類運輸扮演較重要角色(Endler et al. 2006; Reinders et al., 2008)，而由馬鈴薯 *StSUT4* 於細胞膜及內膜系統中存在，卻不於液

胞膜上(Chincinska et al., 2008), 表示並非所有 Group IV 之 SUT 皆於液胞膜上負責醣類之運輸。而 Group V 之 SUT 僅於單子葉植物中發現(OsSUT5, ZmSUT5,6), 但目前為止僅知 OsSUT5 於積儲葉中表現量較高 (Aoki et al., 2003)。

## 2.植物體之醣類感應機制及訊息傳導途徑

醣類於植物生長發育中扮演多重之角色, 其為細胞中能量分子, 亦可作為影響基因表現之訊息因子。目前已知大多數植物皆存在多重的醣類感應機制, 醣類可分別藉由細胞膜上的六碳糖轉運蛋白(hexose transporter)或是其他細胞內訊息受體受刺激後, 傳導訊息給下游基因, 或由植物體中之醣類訊息受體如六碳糖激酶(hexokinase; HXK)、SNF1-like protein等進行訊息之傳導, HXK參與在糖解作用起使步驟, 將葡萄糖磷酸化生成葡萄糖六磷酸鹽(glucose-6-phosphate), 並活化成為訊息因子, 或其本身受活化後進而影響基因的轉錄或對下游基因表現造成影響, 此二途徑被稱為HXK-dependent pathway, (Jang et al., 1997; Rolland et al., 2002; Harrington et al., 2003)。而SNF1-like protein則於植物體中接收到葡萄糖訊息後, 已知其可進一步調控nitrate reductase, sucrose synthase及sucrose phosphate synthase (SPS)等酵素之活性(Bhalerao et al., 1999)。

藉由葡萄糖衍生物或是 HXK 活性抑制劑是區分醣類效應為 HXK-dependent 或 HXK-independent pathway 之方法之一。2-Deoxyglucose (2-DG)及 Mannose 為葡萄糖衍生物, 其可被 HXK 磷酸化為 2-Deoxyglucose-6P 或 Mannose-6-phosphate 但不被進一步利用(Lalonde et al., 1999); 而 6-Deoxyglucose (6-DG)同樣為葡萄糖衍生物, 但其不被 HXK 辨識; 3-O-Methylglucose 類似於 6-DG, 則不易為 HXK 辨識 (Loreti et al., 2001); Mannoheptulose 及 N-acetylglucosamine 皆為 HXK 之抑制劑, 但以 N-acetylglucosamine 之效果較好(Maley et al., 1954; Umemura et al., 1998; Claeysen and Rivoal, 2006)。

此外, 植物荷爾蒙亦參與在植物之醣類訊息傳導途徑, 雖然葡萄糖可做為種



子發芽時之養分來源，但是高濃度之葡萄糖卻會抑制阿拉伯芥種子之發芽及幼苗之生長，且已知植物荷爾蒙 ABA、Auxin、Ethylene 及 Cytokinin 皆可能參與在此一葡萄糖之相關訊息調控途徑(León and Sheen, 2003; Dekkers et al., 2004; Gibson, 2004; Rolland et al., 2006; Rognoni et al., 2007)；且於水稻或大麥亦有研究指出於水稻分離胚培養中外加葡萄糖會改變植物體本身荷爾蒙如 GA 和 ABA 之含量(Yu et al., 1996; Toyofuku et al., 2000; Gibson et al., 2004; Zhu et al., 2009)。

### 3. 醣類對植物蔗糖轉運蛋白之影響

Matsukura 等人(2000)及 Chen (2006)之研究中指出於水稻分離胚培養外加 100 mM 葡萄糖或蔗糖，培養 72 小時後可使胚中 *OsSUT1* 基因表現被提高。不過在其他植物中卻有不一樣的結果，柑橘(*Citrus reticulata*)葉部 *CiSUT1* 在處理 100 mM 葡萄糖或蔗糖後反而會抑制其表現(Li et al., 2003)，蠶豆(*Vicia faba*)的 *VfSUT1* 在胚中之表現亦會受到 150 mM 蔗糖或是葡萄糖的抑制(Weber et al., 1997)，顯示醣類對不同植物之蔗糖轉運蛋白之影響亦可能不同。

在 Conde 等人(2006)的研究指出，雖然葡萄糖可促進葡萄(*Vitis vinifera*)細胞之 *VvHT1*(hexose transporter)基因表現，但高濃度葡萄糖主要經由擴散方式進入葡萄(*Vitis vinifera*)細胞並藉由 HXK 抑制 *VvHT1* 之基因表現及蛋白質轉譯，而在低濃度葡萄糖(<10mM)環境下，葡萄糖則透過 *VvHT1* 進入細胞，此時 *VvHT1* 之蛋白活性較高。此外，於 Chen (2006)所發表之研究則指出於水稻分離胚培養時，外加 100 mM 葡萄糖培養一天，相較於對照組其 *OsSUT1* 之表現會受到抑制，但於培養五天後其表現反而會被提高，可知醣類對於蔗糖轉運蛋白之影響亦會隨著其濃度、植物種類或是處理時間而有不同之效應。

### 3. 本論文研究主題

已知水稻 *OsSUT1* 於種子發芽時，於胚中醣類運載至維管束組織中扮演重要

角色，於本實驗室先前之研究，將水稻胚分離並分別於已知水稻分離胚以葡萄糖處理短時間(一天)及長時間(五天)分別會抑制及促進 *OsSUT1* 之表現，然而不論短或長時間處理，外加葡萄糖皆會促進 *OsSUT2* 之表現(Chen, 2006)。而本論文則是更進一步探討葡萄糖調控水稻胚中 *OsSUT1* 及 *OsSUT2* 表現訊息之途徑，期望在瞭解葡萄糖如何對蔗糖轉運蛋白產生影響後，使未來的水稻種子發芽相關知識更為齊全。



## 材料與方法

### 1. 植物材料

水稻植物材料為高雄農改場提供的94年第二期台農67號水稻種子 (*Oryza Sativa* L. cv. Tainung 67)

### 2. 葡萄糖對水稻蔗糖轉運蛋白基因表現之影響

#### 2.1. 水稻種子胚分離、消毒、培養及各種醣類及藥品之處理

- (1) 利用脫殼器與刀片分離水稻胚
- (2) 將水稻種子分離胚以 0.25% NaOCl 消毒 5 分鐘二次，之後以蒸餾水沖洗數次。
- (3) 將消毒完畢之胚以胚盤接觸 MS 培養液方式，以 26°C 進行黑暗培養。
- (4) 各種醣類處理，直接分別將各種醣類加入 MS 培養液中，但 N-acetylglucosamine (NAG) 處理則先將樣品置於與處理相同濃度 NAG 中 1 小時，而後移至含 NAG 之 MS 培養液中培養。
- (5) 培養後之取材，若有幼芽及根部則利用刀片切除，留下原本之胚部位以萃取 RNA 並進行蔗糖轉運蛋白基因表現分析。
- (6) 各種處理所使用之培養液配方如下

##### (a) 葡萄糖連續濃度對於蔗糖轉運蛋白之影響

1X Murashige and Skoog (MS, pH 5.7-5.8, Control)、1X MS/ 100 mM 葡萄糖 (Glucose, Glc)、1X MS/ 200 mM Glc、1X MS/ 300 mM Glc

##### (b) 六碳糖激酶(Hexokinase)抑制劑 NAG 對於蔗糖轉運蛋白之影響

1X MS (Control)、1X MS/ 20 mM Glc、1X MS/ 20 mM Glc/ 20 mM NAG、1X MS/ 20 mM Glc/ 80 mM NAG、1X MS/ 100 mM Glc、1X MS/ 100 mM Glc/ 100 mM NAG

(c) 葡萄糖類似物對於蔗糖轉運蛋白之影響

1X MS (Control)、1X MS/ 100 mM Glc、1X MS/ 100 mM 3-O-Methyl-Glucose

3. RNA 萃取及基因表現分析

RNA 萃取、RNA 電泳、TURBO DNase 處理及 real-time RT-PCR 步驟見本論文 14-16 頁，所使用之引子則如下表所示：

Real-time RT-PCR 引子列表

Gene	Accession number	Forward primer (5'→3') Reverse primer (5'→3')	Amplicon size (bp)	Annealing temperature(°C)
<i>OsSUT1</i>	D87819	CTGTGATTTTCCTGTCCCTG AACACTGCTAGTGGACCACT	136	58
<i>OsSUT2</i>	AB091672	AGGAGGAGAGGTCACCGATAA CCAACATCCAATGTACAACAGCA	240	58
<i>OsSUT4</i>	AB091673	TTTGGCTGAGCAGAACACCA ATGTCATTCTGGGCAGAGCTT	249	58
<i>Rab16a</i>	99A0378526	CGACACACCACCACAACCATG TGTGTACATATGCACGATGA	294	58
<i>Ubiquitin</i>	D12629	CGCAAGTACAACCAGGACAA TGGTTGCTGTGACCACACTT	101	58

引子設計參考自 Chen et al., 2008

## 4. 水稻胚 ABA 含量偵測

### 4.1. ABA 之萃取

本方法參考自 Hurng 等人(1994)之研究進行 ABA 之萃取

- (1) 水稻樣品依照本論文第 10 頁之方法進行發芽及生長。
- (2) 以每 15 個水稻幼苗胚為一樣品，以液氮並將樣品研磨至粉末狀。
- (3) 待樣品回溫後，加入 2 ml 萃取液 (80% (v/v) 甲醇, 2% glacial acetic acid)。
- (4) 於 4°C 全黑暗下萃取 48 小時。
- (5) 4°C 2000×g 離心 10 分鐘。
- (6) 取 250 µl 上清液真空乾燥。
- (7) 加入 0.5 ml 甲醇(100%)潤洗。
- (8) 加入 0.5 ml 0.2M NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH6.8)，震盪使完全溶解。
- (9) 4°C 靜置 10 min。
- (10) 將樣品以 polyvinylpyrrolidone 管柱進行過濾，再以 6 ml dH<sub>2</sub>O 分三次沖洗並收集濾液。
- (11) 樣品中加入 100 µl glacial acetic acid。
- (12) 以 C<sub>18</sub> 管柱(Agdia, USA)進行過濾。
- (13) 以 4 ml 清洗液(20% (v/v) 甲醇，2% (v/v) glacial acetic acid)清洗。
- (14) 以 4 ml 萃取液(55% (v/v) 甲醇，2% (v/v) glacial acetic acid)並收集濾液。
- (15) 真空乾燥。
- (16) 加入 200 µl TBS buffer(3.03g Trizma base, 5.84g NaCl, 0.2g MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0.2g NaN<sub>3</sub>, 1000 ml, pH7.5)將樣品溶解。

### 4.2. ABA 含量測定

本方法利用 Agdia 公司之 Phytodetek ABA kit，使用之 anti-ABA coated plate,

tracer, wash solution, reaction buffer 皆購自 Agdia 公司(USA)。

- (1) 取 100  $\mu\text{l}$  含 0~1000 pmole ABA 標準液(Sigma, A1049, Canada)或樣品加入至 anti-ABA coated plate 之樣品槽。
- (2) 加入 100  $\mu\text{l}$  tracer 後於 4°C 黑暗下放置 3 小時。
- (3) 將樣品槽的液體倒出並以 200  $\mu\text{l}$  wash solution 清洗樣品，每次 10 min。
- (4) 每個 well 加入 200  $\mu\text{l}$  reaction buffer 後於 405nm 波長下讀取吸光值。
- (5) 計算樣品 ABA 含量。



## 結果

### 1. 不同葡萄糖濃度對水稻分離胚培養中 *OsSUT1, 2* 基因表現之影響

於 Chen(2006)之研究指出，外加 100 mM 葡萄糖於水稻分離胚培養一天後，相較於對照組，*OsSUT1* 基因表現會受到抑制，但於培養五天後其表現卻反而會受到提升，而 *OsSUT2* 之表現則於外加葡萄糖培養五天後表現被提升，並且由同樣濃度 mannitol 處理得知葡萄糖對 *OsSUT1, 2* 基因之表現的影響並非滲透勢造成。為了進一步瞭解葡萄糖對水稻分離胚發芽及 *OsSUT1, 2* 基因之表現影響是否會因葡萄糖濃度改變而不同，於是分別將水稻分離胚處理 100, 200, 300 mM 葡萄糖，並於處理一天及五天後觀察其對 *OsSUT1, 2* 基因表現之影響。如圖一所示，外加 100, 200, 300mM 葡萄糖在培養基中，於培養一天後胚之生長無明顯差異，但於培養五天後胚之生長速度皆較無糖培養之對照組快。於含葡萄糖培養基中培養一天後，*OsSUT1* 基因之表現相較於對照組皆會下降，分別僅有 0.2, 0.2, 0.1 倍，顯示葡萄糖濃度越高，*OsSUT1* 基因之表現受抑制之情形越顯著(圖二 A)。而在培養五天後，*OsSUT1* 基因表現相較於對照組被提升，於外加 100, 200, 300 mM 葡萄糖在培養基中分別為對照組之 1.9, 2.3 倍，但葡萄糖濃度提高至 300 mM 則反而會抑制 *OsSUT1* 之表現，為對照組之 0.5 倍(圖二 B)。由外加葡萄糖在培養一天及五天後對 *OsSUT1* 之基因表現影響有相反結果，為探討其是否因不同胚生長時期對葡萄糖之反應不同，或因葡萄糖處理時間長短造成此一葡萄糖對 *OsSUT1* 表現之不同影響，將另一組植株於不含葡萄糖培養基中培養四天，再移至含 100 mM 葡萄糖培養基中培養一天，結果顯示，其 *OsSUT1* 基因表現亦會被抑制，僅為未經葡萄糖處理之對照組的 0.5 倍(圖三)。

於 *OsSUT2* 部分，外加 100, 200, 300 mM 葡萄糖於培養基中，培養一天後雖有些微促進其基因表現，但分別僅為對照組之 1.3, 1.4, 1.5 倍(圖四 A)，顯示在短時間處理葡萄糖對 *OsSUT2* 之基因表現影響較小；而外加葡萄糖培養五天後即會明顯促進 *OsSUT2* 之基因之表現，其分別為未經糖處理之對照組的 4.0, 6.2, 3.7 倍(圖

四 B)，隨著葡萄糖濃度之提高，促進 *OsSUT2* 基因之表現亦更顯著，但當葡萄糖濃度達 300 mM 反而促進之倍數減少。

## 2. 六碳糖激酶抑制劑 NAG 及葡萄糖類似物 3-OMG 對水稻分離胚培養

### *OsSUT1, 2* 基因表現之影響

糖類在植物訊息傳導途徑可分為 HXK-dependent pathway 或 HXK-independent pathway 之路徑，為了進一步瞭解葡萄糖對 *OsSUT1, 2* 之基因表現影響為何途徑，分別利用六碳糖激酶抑制物 N-acetyl glucosamine(NAG)及葡萄糖衍生物 3-O-Methylglucose(3-OMG)進行研究，NAG 為 HXK 活性抑制物，並且已知其較同為 HXK 抑制劑之 Mannoheptulose 效果更好(Maley et al., 1954; Umemura et al., 1998)，且於 Umemura 等人(1998)之研究亦指出，外加 50 或 100 mM NAG 於水稻分離胚培養中，可抑制大部分 HXK 之活性(其抑制幅度分別約為 75%及 90%)。於 Marshall 等人(1991) 及 Koch 等人(1996)之研究提到葡萄糖與 NAG 彼此在進入細胞時為競爭之關係，而葡萄糖被細胞吸收速率為 NAG 之四倍，為了避免其運輸競爭之關係造成研究之干擾，因此將水稻分離胚分別於含有 20 mM 葡萄糖或是另含有同樣濃度 NAG 或四倍濃度 NAG，以及 100 mM 葡萄糖或 100 mM 葡萄糖另加 100 mM NAG 中培養；並且樣品皆先用其培養同樣濃度 NAG 處理 1 小時後才移到同時含有葡萄糖之培養液，在處理一天及五天後，觀察其對 *OsSUT1, 2* 基因表現之影響。

在水稻分離胚培養時，於培養基中外加 20 mM Glc、100 mM Glc 培養一天後皆會抑制 *OsSUT1* 基因之表現，與前述結果相同，隨外加葡萄糖濃度提高，*OsSUT1* 表現受抑制之情形越明顯，其 *OsSUT1* 基因表現分別為未處理糖類對照組之 0.54, 0.31 倍(圖五 B);於處理葡萄糖同時加入同樣濃度或四倍濃度 NAG 以抑制 HXK 活性，由圖五 A 結果顯示胚外觀於不同處理間無明顯差異，而於 20 mM Glc、20 mM Glc/ 20 mM NAG、100 mM Glc 及 100 mM Glc/ 100 mM NAG 培養一天後皆會抑制



*OsSUT1* 基因之表現，其 *OsSUT1* 基因表現分別為對照組之 0.54, 0.50, 0.31, 0.42 倍，但於 20 mM Glc/ 80 mM NAG 之培養基中培養，則葡萄糖抑制 *OsSUT1* 之基因表現的現象則會消失(圖五 B)，顯示當 NAG 濃度比葡萄糖高三倍則原本葡萄糖抑制 *OsSUT1* 基因之現象就消失了。

另一方面，於水稻分離胚培養時加 20 mM Glc、100 mM Glc 培養五天後皆會促進 *OsSUT1* 基因之表現(圖六 B)；於處理葡萄糖同時加入同樣濃度或四倍濃度 NAG 以抑制 HXK 活性，由圖六 A 結果顯示外加葡萄糖之胚生長速度明顯較未加糖培養之對照組快，但隨著外 NAG 之濃度提高，則胚之生長速度反而較慢。而於 20 mM Glc/ 20 mM NAG、20 mM Glc/ 80 mM NAG 及 100 mM Glc/ 100 mM NAG 培養五天後，不論加入與葡萄糖同樣濃度或四倍濃度 NAG，原本外加葡萄糖會促進 *OsSUT1* 基因表現之現象則消失。3-OMG 為葡萄糖衍生物，雖可進入細胞但其不易為六碳糖激酶辨識，為了進一步做雙重確認，將水稻分離胚於 100 mM 3-OMG 中分別培養一天及五天，其結果顯示不同於葡萄糖抑制或促進 *OsSUT1* 基因之表現(圖七、圖八 B)，可以知道葡萄糖不論於處理一天或五天後對 *OsSUT1* 基因之調控均需藉由 HXK 進行下游訊息之傳導。

而在 *OsSUT2* 部分，於水稻分離胚培養時加 20 mM Glc、100 mM Glc 培養五天後皆會促進 *OsSUT2* 基因之表現(圖六 C)；於處理葡萄糖同時加入同樣濃度或四倍濃度 NAG 以抑制 HXK 活性，在處理五天後，20 mM Glc、20 mM Glc/ 20 mM NAG、20 mM Glc/ 80 mM NAG、100 mM Glc 及 100 mM Glc/ 100 mM NAG 之處理分別為對照組之 2.3, 2.1, 1.7, 2.0, 2.0 倍，顯示外加 NAG 並不影響原本葡萄糖對 *OsSUT2* 基因表現之影響；並且由 100 mM 3-OMG 培養五天後之胚 *OsSUT2* 基因之表現亦會受到提升；可知葡萄糖在處理五天後對 *OsSUT2* 基因之調控為 HXK-independent pathway。

### 3. 水稻種子發芽時胚中 ABA 含量及外加葡萄糖對 ABA 敏感基因 *Rab16a* 之影響

於 Chen(2006)之研究指出，水稻種子發芽時，胚中 *OsSUT1* 之表現會受光照、醣類或是植物荷爾蒙 GA 及 ABA 之調控，並且其指出外加 GA 會促進 *OsSUT1* 之表現，而 ABA 則會抑制其基因表現，於 Yu 等人(1996)、Toyofuku 等人(2000)、Gibson 等人(2004)及 Zhu 等人(2009)之研究分別指出水稻種子發芽時外加葡萄糖會改變胚中荷爾蒙 GA 及 ABA 之含量。為了探討葡萄糖對水稻分離胚培養時，於浸潤一天及五天後分別對 *OsSUT1* 造成不同影響，是否可能為葡萄糖及植物荷爾蒙間交互作用所產生之結果，首先偵測水稻種子發芽時，胚中 ABA 之含量變化，結果顯示其含量於種子發芽後持續下降(圖九 A)；於 Toyofuku 等人(2000)之研究發現水稻中對 ABA 表現敏感之基因 *Rab16a*，因此以 *Rab16a* 為指標基因代表胚中 ABA 之含量變化，種子浸潤五天後之 *Rab16a* 基因表現較浸潤一天後低，此與 ABA 含量變化相符；並且於外加葡萄糖後，不論於浸潤一或五天後其 *Rab16a* 表現皆較對照組低，推測外加葡萄糖會使胚中 ABA 含量下降(圖九 B)，並且葡萄糖對 *OsSUT1* 基因表現之影響應為葡萄糖及荷爾蒙效應共同調控。



## 討論

### 1. 葡萄糖對水稻分離胚培養之影響

在Chen(2006)的研究中指出，於水稻分離胚培養時外加100 mM葡萄糖會促進種子發芽及生長，過去卻有多篇阿拉伯芥之相關研究指出，雖然葡萄糖可作為植物生長之養分來源，但高濃度之葡萄糖卻會抑制阿拉伯芥種子之發芽及幼苗之生長(León and Sheen, 2003; Dekkers et al., 2004; Gibson, 2004; Rolland et al., 2006; Rognoni et al., 2007)，並且於Zhu等人(2009)之研究指出，外加葡萄糖亦會抑制水稻種子發芽及幼苗生長。而由圖一可知，外加100~300 mM葡萄糖在培養基培養五天後，胚之發芽速和生長速度皆較未加糖培養之對照組快；此與上述阿拉伯芥或水稻種子之研究有不同之結果，推測於完整種子及水稻分離胚培養間，因種子胚乳或子葉中儲存之澱粉於種子發芽後亦會轉變為水溶性糖類並運至胚中，因此造成外加葡萄糖對水稻分離胚或完整種子間對外加葡萄糖有不同之反應。

### 2. 葡萄糖對水稻*OsSUT1*影響可能之調控機制

於Chen(2006)所發表之研究結果指出，水稻分離胚分別於含有100 mM葡萄糖或麥芽糖、蔗糖之培養基中培養，培養1天(短時間)後會抑制胚中*OsSUT1*表現，但培養5天(長時間)後則會促進其表現，並且由同樣濃度mannitol並不對*OsSUT1*表現有相同影響，其指出葡萄糖對*OsSUT1*表現影響並非滲透逆境(osmotic stress)所造成，並且其發現此三種糖類以葡萄糖對*OsSUT1*表現之影響最為明顯。在本研究中進一步發現，隨著外加葡萄糖濃度(100-300 mM)增加，於處理1天後抑制*OsSUT1*之表現亦越明顯(圖二A)；在處理5天後，隨著葡萄糖濃度提高則會促進*OsSUT1*之表現(圖二B)，且由無論由胚浸潤後即以含葡萄糖培養液培養一天或是浸潤後四天才將分離胚移到含100 mM葡萄糖培養液中培養一天皆會抑制*OsSUT1*基因之表現(圖二A、圖三B)，推測葡萄糖對*OsSUT1*基因表現之影響主要是因處理時間之長短所致；然而，由乾燥之水稻胚或於MS培養基中培養四天後才處理葡萄糖一天，對

*OsSUT1*之表現影響程度不同，推測水稻胚之不同生育時期對葡萄糖反應亦可能不同；並且，由外加300 mM葡萄糖於培養基中培養五天後反而會抑制*OsSUT1*之表現，推測在更高濃度葡萄糖處理下，滲透逆境或其他逆境反應機制(如植物荷爾蒙ABA)亦可能參與在*OsSUT1*表現之調控。

已知HXK為糖類調控植物基因訊息傳導途徑中關鍵角色，並可因此分為HXK-dependent pathway或HXK-independent pathway，於本研究中利用HXK抑制劑NAG及葡萄糖衍生物3-OMG確定葡萄糖對*OsSUT1*之影響為HXK-dependent pathway。雖然於實驗時另外也有利用葡萄糖衍生物2-Deoxyglucose(2-DG)進行處理，其可被HXK磷酸化為2-Deoxyglucose-6P但不被進一步利用，然而100 mM 2-DG處理後之樣品無生長跡象(結果未秀出)，可能為某些無法被代謝之葡萄糖類似物會導致細胞Pi不平衡而造成傷害，因此未來在利用葡萄糖衍生物探討醣類是否需透過HXK進行訊息傳導時，其不同衍生物是否對植物會造成其他傷害亦是需要注意之處(Herold and Lewis, 1977; Bessellet and Thomas, 1973a; Bessellet and Thomas, 1973b; Gragham et al., 1994; Jang and Sheen, 1994)。於Umemura等人(1998)之研究亦指出，外加50或100 mM NAG於水稻分離胚培養中，雖可抑制大部分HXK之活性(其抑制幅度分別約為75%及90%)，但由HXK活性並無完全被抑制，可能為HXK之不同調控基因對NAG之敏感度亦不同，而水稻胚中已知HXK有六種不同之蛋白形式(isoform)存在，共有十個調控之基因(Guglielminetti et al., 2000; Cho et al., 2006)，故此處研究仍無法分辨在短時間(一天)及長時間(五天)葡萄糖對*OsSUT1*之影響是否為藉由相同HXK調控。

雖然已知於水稻分離胚培養時外加葡萄糖不僅會改變胚中葡萄糖濃度，亦會造成其他醣類含量改變(Matsukura et al., 2000)，然而由本實驗室未發表之研究及Matsukura等人(2000)之研究分別指出，水稻分離胚在100 mM葡萄糖培養基中培養一天跟五天後，胚中蔗糖、葡萄糖和果糖含量並無太大差異，推測葡萄糖於短時間和長時間處理可能不是其濃度改變所造成。此外，於本研究中亦發現外加100 mM

葡萄糖於水稻胚培養一天或五天後相較於未加糖培養之對照組，其ABA含量指標基因*Rab16a*皆受抑制(圖九B)，並且已知水稻種子發芽時，外加葡萄糖亦會抑制胚中GA和ABA之含量(Gibson et al., 2004; Toyofuku et al., 2000; Yu et al., 1996; Zhu et al., 2009)，於Chen (2006)之研究指出，水稻胚中*OsSUT1*之表現亦會受到外加GA<sub>3</sub>之促進而被ABA抑制，推測葡萄糖對*OsSUT1*之影響可能為葡萄糖及荷爾蒙間交互作用所產生之結果。

### 3. 葡萄糖對水稻*OsSUT2*影響可能之調控機制

在Chen (2006)所發表之研究指出，水稻分離胚於外加100 mM葡萄糖中培養五天後，*OsSUT2*之基因表現會被提升。在本研究中進一步發現，隨著外加葡萄糖濃度(100-300 mM)增加，此一表現被提升之現象更為明顯。並且，葡萄糖對*OsSUT2*之表現調控為HXK-independent pathway，然而目前已知細胞膜上之受體如其他之糖類轉運蛋白、Regulator of G protein Signaling (RGS1)等基因或酵素皆可進行訊息之傳導( Godt et al., 1995; Roitsch et al., 1995; Ehness et al., 1997; Xiao et al., 2000; Rolland et al., 2006; Claeysen et al., 2007)，葡萄糖對水稻種子發芽時*OsSUT2*之基因表現調控仍須進一步之研究進行探討。

### 4. 結論及未來研究

綜合本研究之結果，可知水稻種子發芽過程中，外加葡萄糖於水稻分離胚培養分別對*OsSUT1, 2* 之基因表現造成不同之影響，由葡萄糖於短時間及長時間處理對*OsSUT1*之表現有不同影響，以及ABA及GA等植物荷爾蒙亦可能參與在此一葡萄糖對*OsSUT1*影響之調控途徑，顯示種子發芽時，胚中*OsSUT1*之表現調控機制是由多種因子共同進行。為了進一步去探討葡萄糖及荷爾蒙間交互作用對*OsSUT1*之影響，於未來之研究可藉由啟動子(Promoter)序列分析，並可利用暫時性表現(transient expression)或轉殖技術(stable transformation)進一步尋找可能相關之調控

cis-element或是transcription factor，以更進一步瞭解葡萄糖及荷爾蒙間交互作用對種子發芽時胚中*OsSUT1*之表現影響。而在*OsSUT2*部分，外加葡萄糖於水稻分離胚培養之培養液中，隨著處理之時間增長，其基因表現被促進之幅度亦越大，然而，葡萄糖對*OsSUT2*表現之影響為HXK-independent pathway，此一葡萄糖對*OsSUT2*基因表現之詳細調控途徑仍須進一步實驗探討。



## 參考文獻

- Aoki N, Hirose T, Scofield GN, Whitfeld PR, Furbank RT** (2003) The sucrose transporter gene family in rice. *Plant Cell Physiol* 44: 223-232
- Aoki N, Scofield GN, Wang XD, Offler CE, Patrick JW, Furbank RT** (2006) Pathway of sugar transport in germinating wheat seeds. *Plant Physiol* 141: 1255-1263
- Barker L, Kühn C, Weise A, Schulz A, Gebhardt C, Hirner B, Hellmann H, Schulze W, Ward JM, Frommer WB** (2000) SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. *Plant Cell* 12:1153-1164
- Barth I, Meyer S, Sauer N** (2003) PmSUC3: characterization of a SUT2/SUC3-type sucrose transporter from *Plantago major*. *Plant Cell* 15:1375-1385
- Bessell EM, Thomas P** (1973a) The deoxyfluoro-D-glucopyranose-6-phosphates and their effect on yeast glucose phosphate isomerase. *Biochem J* 131: 77-82
- Bessell EM, Thomas P** (1973b) The effect of substitution at C-2 of D-glucose 6-phosphate on the rate of dehydrogenation by glucose 6-phosphate dehydrogenase (from yeast and from rat liver). *Biochem J* 131: 83-89
- Bhalerao RP, Salchert K, Bako L, Okresz L, Szabados L, Muranaka T, Machida Y, Schell J, Koncz C** (1999) Regulatory interaction of PRL1 WD protein with *Arabidopsis* SNF1-like protein kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5322-5327
- Braun DV, 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
- Bürkle L, Hibberd JM, Quick WP, Kühn C, Hirner B, Frommer WB** (1998) The H<sup>+</sup>-sucrose cotransporter NtSUT1 is essential for sugar export from tobacco leaves. *Plant Physiol* 118: 59-68
- Bush DR** (1993) Proton-coupled sugar and amino acid transporters in plants. *Plant Mol Biol* 44: 513-542
- Carpaneto A, Geiger D, Bamberg E, Sauer N, Fromm J, Hedrich R** (2005) Phloem-localized, proton-coupled sucrose carrier *ZmSUT1* mediates sucrose efflux under the control of the sucrose gradient and the proton motive force. *J Biol Chem* 280: 21437-21443
- Chen JY** (2006) Regulation of sucrose transporter genes in rice embryos during seed germination. Master Thesis. Department of Agronomy, College of Bioresources and Agriculture, National Taiwan University
- 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

- Claeysen, Rivoal J** (2006) Isozymes of plant hexokinase: occurrence, properties and functions. *Phytochemi* 68: 709-731
- Conde C, Agasse A, Glissant D, Tavares R, Gerós H, Delrot S** (2006) Pathways of glucose regulation of monosaccharide transport in grape cells. *Plant Physiol* 141: 1563-1577
- Cortes S, Gromova M, Evrard A, Roby C, Heyraud A, Rolin DB, Raymond P, Brouquisse RM** (2003) In plants, 3-O-methylglucose is phosphorylated by hexokinase but not perceived as a sugar. *Plant Physiol* 131:824–837
- Dekkers BJW, Schuurmans JAMJ, Smeekens SCM** (2008) Interaction between sugar and abscisic acid signalling during early seedling development in arabidopsis. *Plant Mol Biol* 67: 151-167
- Dekkers BJW, Schuurmans JAMJ, Smeekens SCM** (2004) Glucose delays seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 218: 579-588
- DeWitt ND, Sussman MR** (1995) Immunocytological localization of an epitope-tagged plasma membrane proton pump (H<sup>+</sup>-ATPase) in phloem companion cells. *Plant Cell* 7: 2053-2067
- Endler A, Meyer S, Schelbert S** (2006) Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and arabidopsis mesophyll cells by a tonoplast proteomic approach. *Plant Physiol* 141:196-207
- Furbank RT, Scofield GN, Hirose T, Wang XD, Patrick JW, Offler CE** (2001) Cellular localisation and function of a sucrose transporter OsSUT1 in developing rice grains. *Funct Plant Biol* 28: 1187-1196
- Gibson SI** (2000) Plant sugar-response pathways. Part of a complex regulatory web. *Plant Physiol* 124:1532-1539
- Gibson SI** (2004) Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network. *J Exp Bot* 55:253-264
- Gottwald JR, Krysan PJ, Young JC, Evert RF, Sussman MR** (2000) Genetic evidence for the in planta role of phloem-specific plasma membrane sucrose transporters. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13979-13984
- Graham IA, Denby KJ, Leaver CJ** (1994) Carbon catabolite repression regulates glyoxylate gene expression in cucumber. *Plant Cell* 6: 761-772
- Hackel A, Schauer N, Carrari F, Fernie AR, Grimm B, Kühn C** (2006) Sucrose transporter LeSUT1 and LeSUT2 inhibition affects tomato fruit development in different ways. *Plant J* 45: 180-192
- Harrington GN, Busha DR** (2003) The bifunctional role of hexokinase in metabolism and glucose signaling. *Plant Cell* 15: 2493-2496
- Herold A, Lewis DH** (1977) Mannose and green plants: occurrence, physiology and metabolism, and use as a tool to study the role of orthophosphate. *New Phytol*

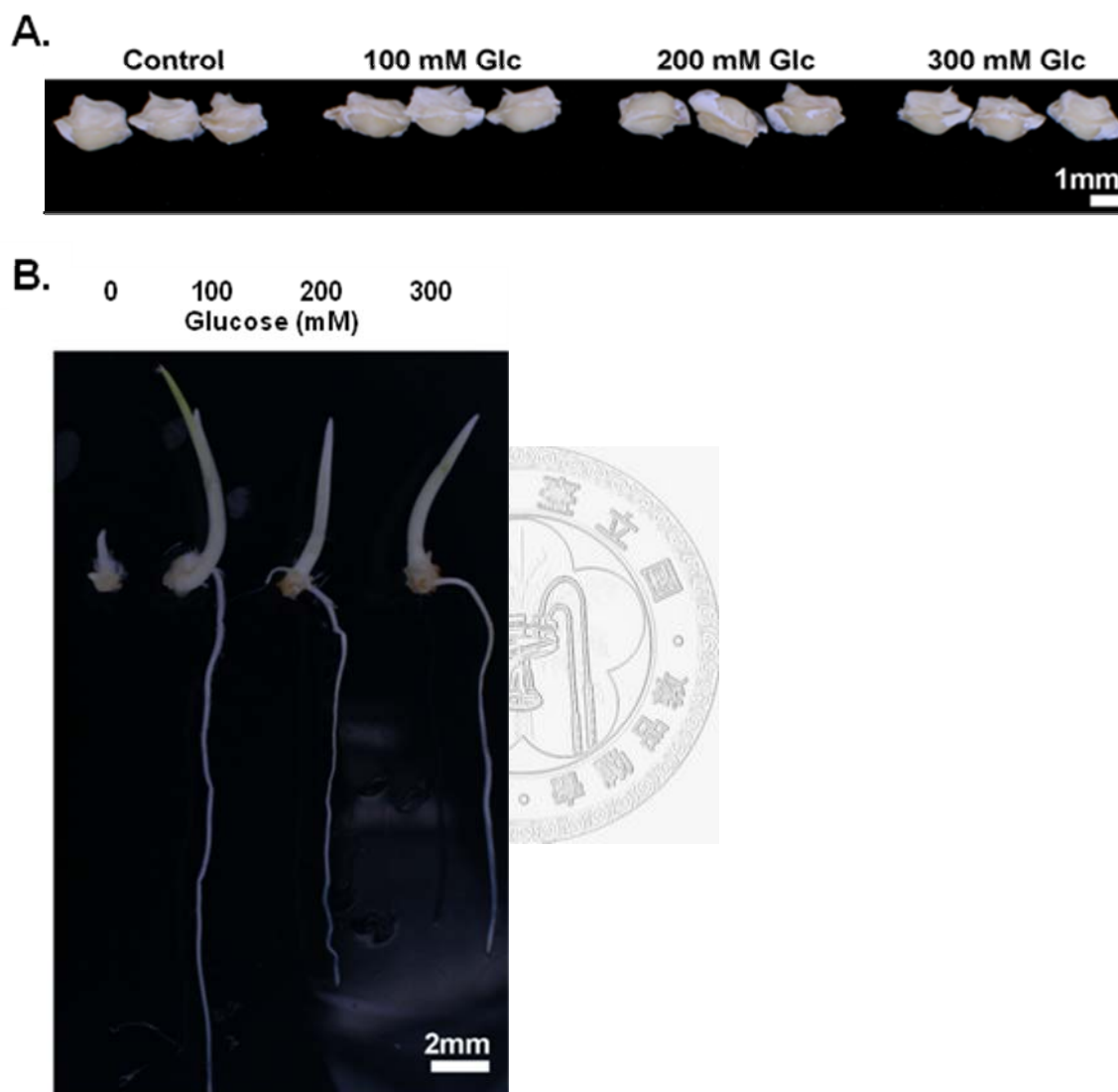


79: 1-40.

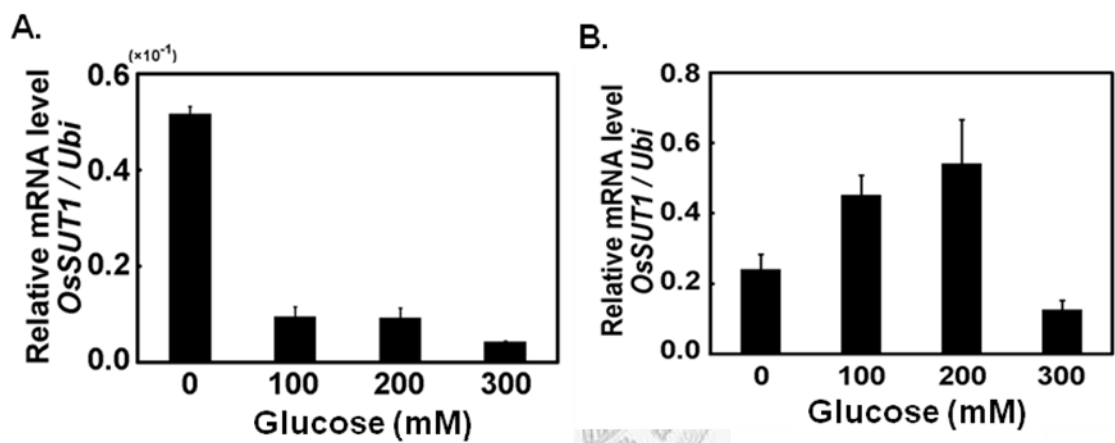
- Hirose T, Imaizumi N, Scofield GN, Furbank RT, Ohsugi R** (1997) cDNA cloning and tissue specific expression of a gene for sucrose transporter from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiol* 28:1389-1396
- Ishimaru K, Hirose T, Aoki N, Takahashi S, Ono K, Yamamoto S, Wu J, Saji S, Baba T, Ugaki M** (2001) Antisense expression of a rice sucrose transporter OsSUT1 in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiol* 42: 1181-1185
- Jang JC, León P, Li Zhou, Sheen J** (1997) Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *Plant Cell* 9:5-19
- Lalonde S, Boles E, Hellmann H, Barker L, Patrick JW, Frommer WB, Ward JM** (1999) The dual function of sugar carriers: transport and sugar sensing. *Plant cell* 11:707-726
- Lalonde S, Wipf D, Frommer WB** (2004) Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Annu Rev Plant Physiol* 55: 341-372
- León P, Sheen J** (2003) Sugar and hormone connections. *Trends Plant Sci* 8: 110-116
- Li C, Shi JX, Weiss D, Goldschmidt EE** (2003) Sugars regulate sucrose transporter gene expression in citrus. *Biochem Biophys Res Commun* 306: 402-407
- Lim JD, Cho J, Park Y, Hahn TR, Choi SB, Jeoh JS** (2006) Sucrose transport from source to sink seeds in rice. *Physiol Plant* 126:572-584
- Loreti E, Bellis LD, Alpi A, Perata P** (2001) Why and how do plant cells sense sugars? *Ann Bot* 88:803-812
- Maley F, Lardy HA** (1954) Synthesis of N-substituted glucosamines and their effect on hexokinase. *J Biol Chem* 195 214:765-773
- Matsukura CA, 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
- Meyer S, Melzer M, Truernit E, Hummer 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
- Meyer S, Lauterbach C, Niedermeier M, Barth I, Sjolund RD, Sauer N** (2004) Wounding enhances expression of *AtSUC3*, a sucrose transporter from Arabidopsis sieve elements and sink tissues. *Plant Physiol* 134:684-693
- Rae AL, Perroux JM, Grof CPL** (2005) Sucrose partitioning between vascular bundles and storage parenchyma in the sugarcane stem: a potential role for the ShSUT1 sucrose transporter. *Planta* 220: 817-825

- Reinders A, Sivitz A, Starker C, Gantt J, Ward J** (2008) Functional analysis of LjSUT4, a vacuolar sucrose transporter from *Lotus japonicus*. *Plant Mol Biol* 68:289-299
- Riesmeier JW, Willmitzer L, Frommer WB** (1992) Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *EMBO J* 11: 4705-4713
- Riesmeier JW, Willmitzer L, Frommer WB** (1994) Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. *EMBO J* 13: 1-7
- Rognoni S, Teng S, Arru L, Smeekens SCM, Perata P** (2007) Sugar effects on early seedling development in arabidopsis. *Plant Growth Regul* 52:217-228
- Rolland F, Moore B, Sheen J** (2002) Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* 14: 185-205
- Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J** (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* 57: 675-709
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory press, NY
- Sauer N** (2007) Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Lett* 581: 2309-2317
- Schneider 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 CLD, Furbank RT** (2007a) The role of the sucrose transporter, *OsSUT1*, in germination and early seedling growth and development of rice plants. *J Exp Bot* 58:483-495
- Scofield GN, Hirose T, Aoki N, Furbank RT** (2007b) Involvement of the sucrose transporter, *OsSUT1*, in the long-distance pathway for assimilate transport in rice. *J Exp Bot* 58: 3155-3169
- Sivitz AB, Reinders A, Johnson ME, Krentz AD, Grof CPL, Perroux JM, Ward JM** (2007) Arabidopsis sucrose transporter AtSUC9. High-affinity transport activity, intragenic control of expression, and early flowering mutant phenotype. *Plant Physiol* 143:188-198
- Srivastava AC, Ganesan S, Ismail IO, Ayre BG** (2008) Functional characterization of

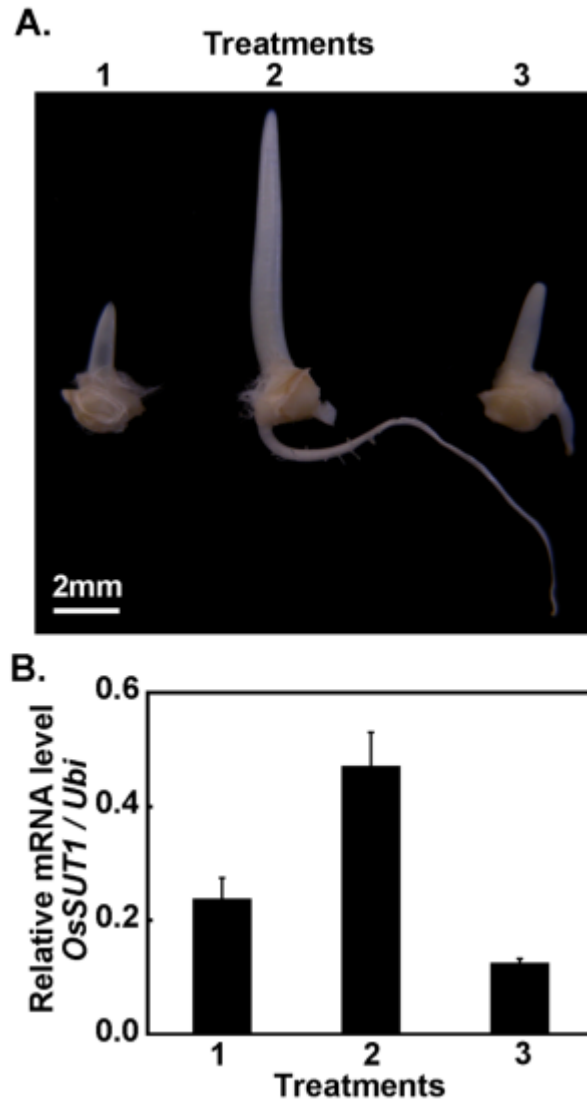
- the *Arabidopsis thaliana* AtSUC2 Suc/H<sup>+</sup> symporter by tissue-specific complementation reveals an essential role in phloem loading but not in long-distance transport. *Plant Physiol* 147: 200-211
- Stadler R, Sauer N** (1996) The *Arabidopsis thaliana* AtSUC2 gene is specifically expressed in companion cells. *Bot Acta* 109: 299-306
- Toyofuku K, Loreti E, Vernieri P, Alpi A, Perata P, Yamaguchi J** (2000) Glucose modulates the abscisic acid-inducible *Rab16A* gene in cereal embryos. *Plant Mol Biol* 42: 451-460
- Truernit E, Sauer N** (1995) The promoter of the *Arabidopsis thaliana* SUC2 sucrose-H<sup>+</sup> symporter gene directs expression of b-glucuronidase to the phloem: evidence for phloem loading and unloading by SUC2. *Planta* 196: 564-570
- Umemura T, Perata P, Futsuhara Y, Yamaguchi J** (1998) Sugar sensing and  $\alpha$ -amylase gene repression in rice embryos. *Planta* 204: 420-428
- Weber H, Borisjuk L, Heim U, Sauer N, Wobusa U** (1997) A role for sugar transporters during seed development: molecular characterization of a hexose and a sucrose carrier in fava bean seeds. *Plant Cell* 9: 895-908
- Weise A, Barker L, Kühn C, Lalonde S, Buschmann H, Frommer WB, Ward JM** (2000) A new subfamily of sucrose transporters, SUT4, with low affinity/high capacity localized in enucleate sieve elements of plants. *Plant Cell* 12: 1345-1355
- 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
- Yu SM, Lee YC, Fang SC, Chan MT, Hwa SF, Liu LF** (1996) Sugars act as signal molecules and osmotica to regulate the expression of  $\alpha$ -amylase genes and metabolic activities in germinating cereal grains. *Plant Mol Biol* 30: 1277-1289
- Zhu G, Ye N, Zhang J** (2009) Glucose-induced delay of seed germination in rice is mediated by the suppression of ABA catabolism rather than an enhancement of ABA biosynthesis. *Plant Cell Physiol* 50: 644-651



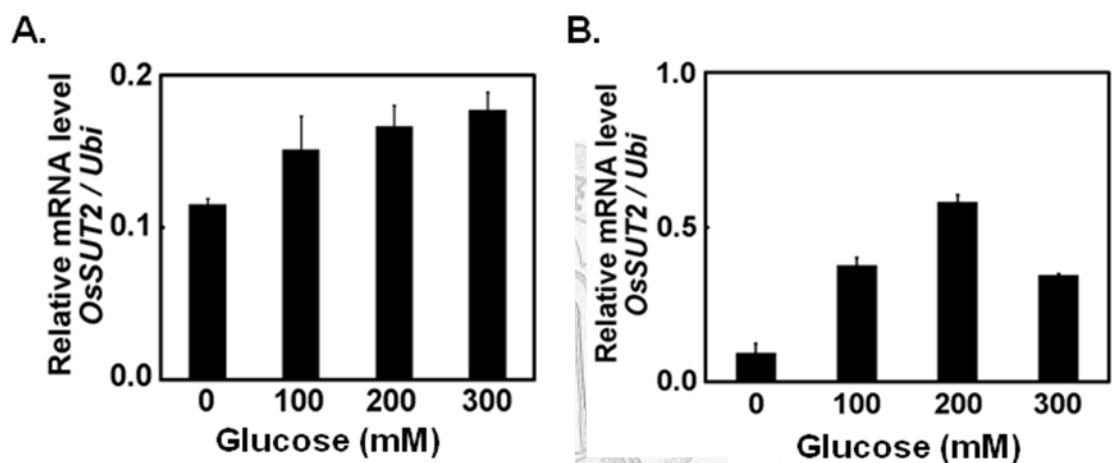
圖一、不同葡萄糖濃度對水稻分離胚培養一天及五天後，植株之生長情形。 A.培養一天及 B.培養五天後植株之生長情形。不同濃度分別為 1X MS/ 0 mM Glc、1X MS/ 100 mM Glc、1X MS/ 200 mM Glc、1X MS/ 300 mM Glc。



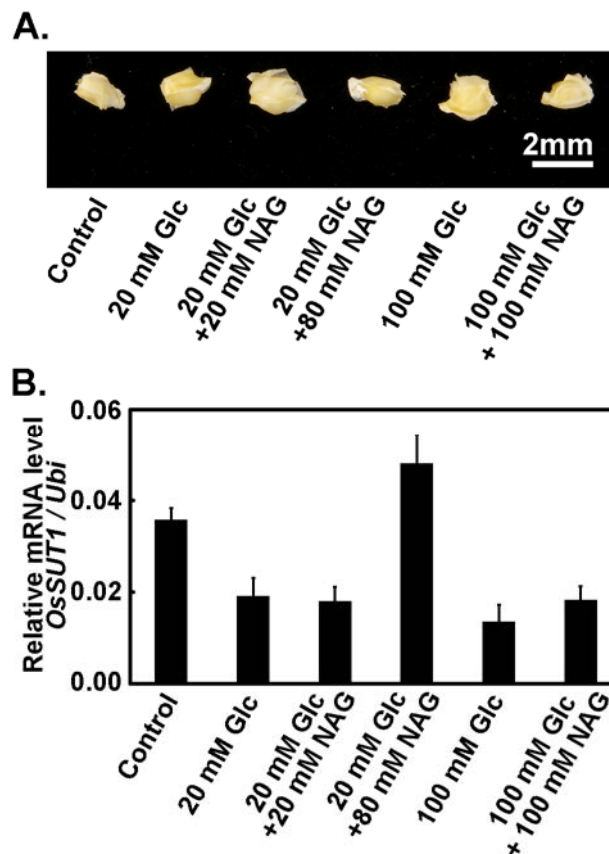
圖二、不同葡萄糖濃度對水稻分離胚培養一天及五天後，對 *OsSUT1* 基因表現之影響。A. 培養一天及 B. 培養五天後，利用 real-time RT-PCR 進行 *OsSUT1* 基因表現之分析。水稻分離胚經過消毒後，分別置於 1X MS、1X MS/ 100 mM Glc、1X MS/ 200 mM Glc、1X MS/ 300 mM Glc 培養，結果為三重複的平均值，誤差值以 standard error(S.E.)表示。



圖三、不同生育時間處理葡萄糖對水稻分離胚生長及 *OsSUT1* 表現之影響。水稻分離胚分別置於 1X MS(處理 1)、1X MS/ 100mM Glc 培養五天(處理 2)或在 1X MS 培養四天再移到 1X MS/ 100 mM Glc 培養一天後(處理 3)分別觀看 A.植株生長情形和 B.利用 real-time RT-PCR 進行 *OsSUT1* 基因表現之分析。結果為三重複的平均值，誤差值以 standard error(S.E.)表示。

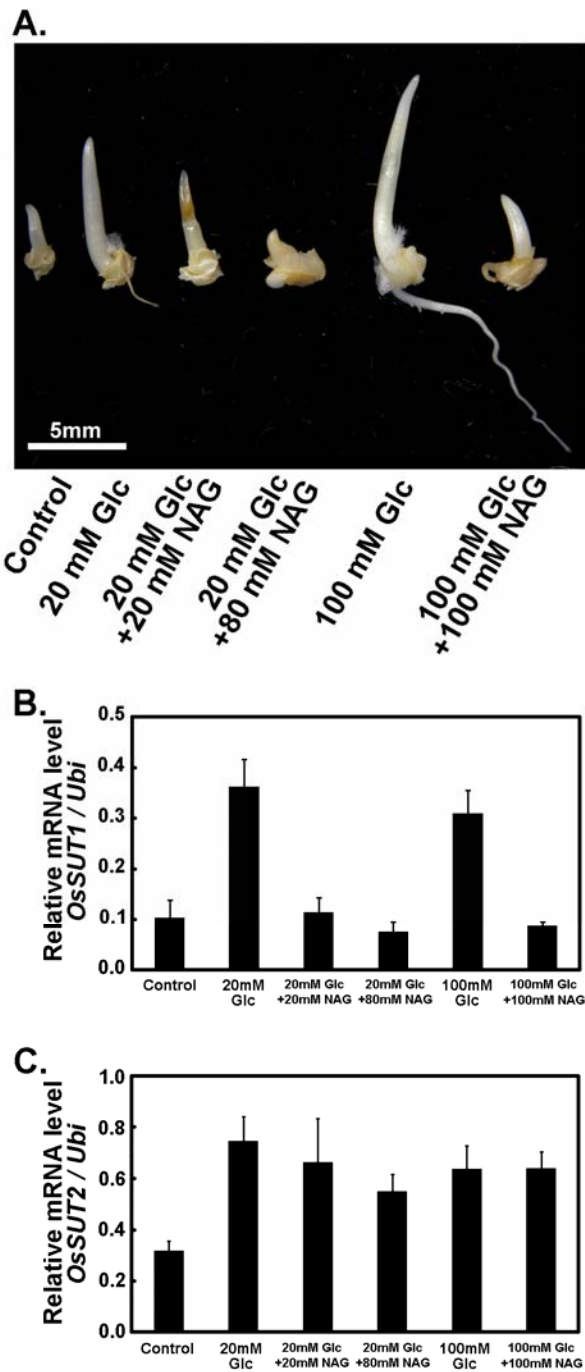


圖四、不同葡萄糖濃度對水稻分離胚培養一天及五天後，對 *OsSUT2* 基因表現之影響。 A. 培養一天及 B. 培養五天後，利用 real-time RT-PCR 進行 *OsSUT2* 基因表現之分析。水稻分離胚經過消毒後，分別置於 1X MS、1X MS/ 100 mM Glc、1X MS/ 200 mM Glc、1X MS/ 300 mM Glc 培養，結果為三重複的平均值，誤差值以 standard error(S.E.)表示。

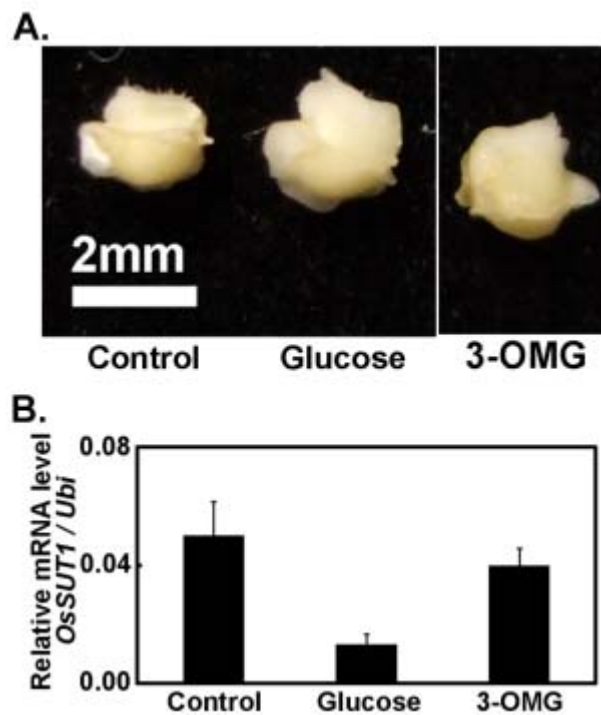


圖五、葡萄糖和六碳糖激酶(Hexokinase)抑制劑 N-acetylglucosamine 對水稻分離胚培養一天後植株的生長情形和對 *OsSUT1* 基因表現之影響。 A.植株的生長情形。 B.利用 real-time RT-PCR 進行胚中 *OsSUT1* 基因表現之分析。水稻分離胚經過消毒後，處理 NAG 之樣品先置於與其處理同樣濃度 NAG 中處理 1 小時，之後分別置於 1X MS (Control)、1X MS/ 20 mM Glc、1X MS/ 20 mM Glc/ 20 mM NAG、1X MS/ 20 mM Glc/ 80 mM NAG、1X MS/ 100 mM Glc、1X MS/ 100 mM Glc/ 100 mM NAG 培養，並於培養後一天收取樣本。結果為三至四重複的平均值，誤差值以 standard error(S.E.)表示。NAG, N-acetylglucosamine。

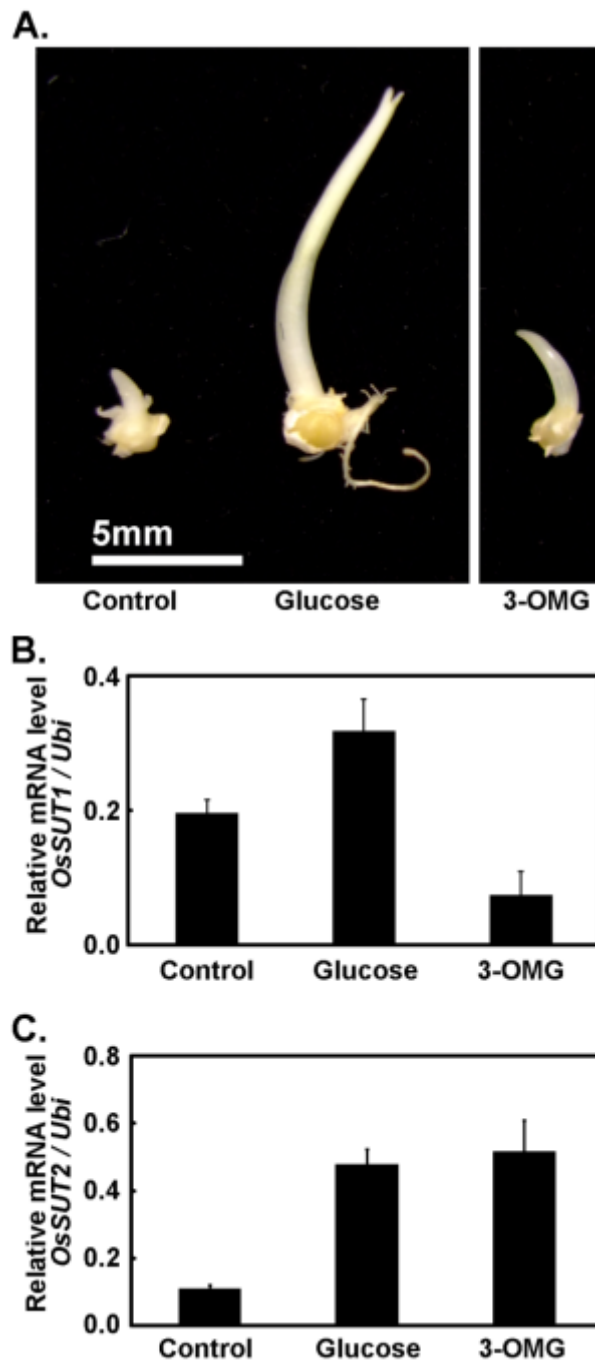




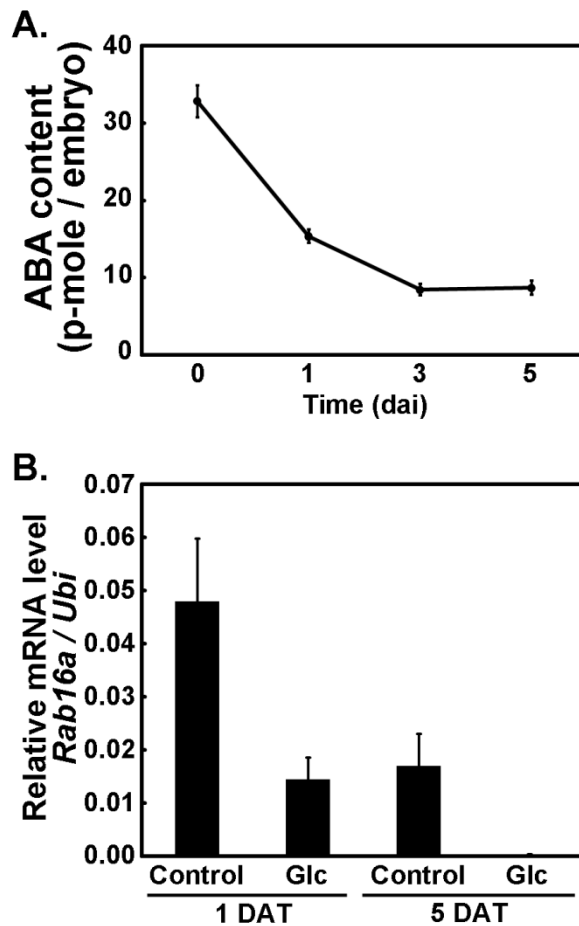
圖六、葡萄糖和六碳糖激酶(Hexokinase)抑制劑 N-acetylglucosamine 對水稻分離胚培養五天後植株的生長情形和對 *OsSUT1, 2* 基因表現之影響。 A.植株的生長情形。 B.利用 real-time RT-PCR 進行 *OsSUT1* 基因表現之分析。 C.利用 real-time RT-PCR 進行 *OsSUT2* 基因表現之分析。水稻分離胚經過消毒後，處理 NAG 之樣品先置於與處理時同樣濃度 NAG 中處理 1 小時，之後分別置於 1X MS (Control)、1X MS/ 20 mM Glc、1X MS/ 20 mM Glc/ 20 mM NAG、1X MS/ 20 mM Glc/ 80 mM NAG、1X MS/ 100 mM Glc、1X MS/ 100 mM Glc/ 100 mM NAG 培養，並於培養後五天收取樣本。結果為三至四重複的平均值，誤差值以 standard error(S.E.)表示。NAG, N-acetylglucosamine。



圖七、葡萄糖及葡萄糖類似物 3-OMG 對水稻分離胚培養一天後植株的生長情形和對 *OsSUT1* 基因表現之影響。 A. 植株的生長情形。 B. 利用 real-time RT-PCR 進行 *OsSUT1* 基因表現之分析。水稻分離胚經過消毒後，分別置於 1X MS (Control)、1X MS/ 100 mM Glc、1X MS/ 100 mM 3-OMG 培養，並於培養後一天收取樣本。結果為三至四重複的平均值，誤差值以 standard error(S.E.)表示。3-OMG, 3-O-Methyl glucose。



圖八、葡萄糖及葡萄糖類似物 3-OMG 對水稻分離胚培養五天後植株的生長情形和對 *OsSUT1, 2* 基因表現之影響。A.植株的生長情形。B.利用 real-time RT-PCR 進行 *OsSUT1* 基因表現之分析。C.利用 real-time RT-PCR 進行 *OsSUT2* 基因表現之分析。水稻分離胚經過消毒後，分別置於 1X MS (Control)、1X MS/ 100 mM Glc、1X MS/ 100 mM 3-OMG 培養，並於培養後 5 天收取樣本。結果為三至四重複的平均值，誤差值以 standard error(S.E.)表示。3-OMG, 3-O-Methyl glucose。



圖九、水稻種子發芽時胚中 ABA 含量變化及外加葡萄糖對胚中 ABA 敏感基因 *Rab16a* 表現之影響。A. 水稻種子發芽時，胚中 ABA 含量之變化情形。B. 水稻分離胚經過消毒後，分別置於 1X MS (control)、1X MS/ 100 mM Glc 培養，並於培養後一及五天收取樣本，進行 *Rab16a* 之基因表現分析。dai, days after imbibitions; DAT, days after treatment。