

吉貝素、細胞分裂素及真菌抽出物對水稻細胞 澱粉酶之誘導

周瑞琪 童武夫

國立臺灣師範大學生物學系所

摘 要

水稻懸浮細胞對環境因子刺激之反應為本研究之探討重點。吉貝素(Gibberellin)和細胞分裂素(Benzyladenine)可以促進細胞的生長，但不能延後細胞的老化。這兩種植物調節素都能明顯誘導 α -及 β -澱粉酶的合成及釋出，其中以吉貝素的誘導作用較佳。以葡萄糖為唯一碳源時，並不會抑制澱粉酶的被誘導。顯示植物調節素的刺激，會使水稻細胞的代謝作用增強，而反應於細胞的生長及澱粉酶的釋出。

真菌抽出物(Fungal elicitor)的處理，也能誘導培養基中澱粉酶活性增高，同時也促進細胞內過氧化酶及苯丙胺酸去胺酶活性增強。顯示真菌抽出物誘發了細胞的防禦機制，促使一些有關的基因表現，而提高了細胞的代謝活性。

關鍵詞：水稻細胞、澱粉酶誘導

緒 言

禾本科植物種子發芽時，胚會產生吉貝素(Gibberellin)，並傳送到糊粉層，刺激細胞合成、分泌 α -澱粉酶到胚乳中，以分解貯存澱粉，產生單醣供給胚之生長所需(Ho *et al.*, 1987)。這種吉貝素的刺激作用能誘導糊粉層細胞 α -澱粉酶基因，大量轉錄及轉譯，合成酶分子(O'Neill *et al.*, 1990)。

β -澱粉酶亦為分解貯存澱粉之重要酶，也廣泛地存在高等植物及

微生物(Shewry *et al.*, 1988)。芥菜的子葉中 β -澱粉酶的合成會受光照誘導，並隨著光合機構的發育而活性增高(Shara and Schopfer, 1982; 1987; Subbaramaiah and Sharma, 1989)。穀類種子之 β -澱粉酶於萌發時，即有新合成(Hardie, 1975)。水稻種子萌發時，內子葉會合成 β -澱粉酶，而糊粉層則能釋出 α -澱粉酶(Okamoto and Akazawa, 1986)。

無論是單子葉植物種子之糊粉層細胞，或雙子葉植物種子之子葉，皆為高度分化之細胞、組織，可依生理上的需要反應環境因子的

刺激。前人的研究結果顯示，植物的基因組中 α -和 β -澱粉酶基因應共同存在，祇是在基因表現分別受到其專一性的誘導而有所差異。懸浮培養之細胞為未分化細胞，其對環境因子刺激之反應可能會和已分化的細胞、組織有所不同。以懸浮細胞為實驗材料之最大優點，就是環境因子之變動易於控制。Yu 等人 (1991) 就曾演示，水稻懸浮細胞在缺乏碳源之培養基中，可以被誘導大量 α -澱粉酶的合成。在經24小時的處理，可促使細胞內 α -澱粉酶的 mRNA 增高到七倍之多。

利用酶的物理、化學性質之差異性，可以在酶活性測定時，將 α -及 β -澱粉酶大略加以區分；通常 α -澱粉酶表現活性時，需要鈣離子的活化，且在低 pH 值時則會失去活性。相對地， β -澱粉酶則對高溫及重金屬離子敏感，並不需要鈣離子就能呈現其活性 (Bilderback, 1973)。

本實驗就以水稻細胞為材料，觀察植物調節素，吉貝素 (Gibberellin)、細胞分裂素 (Benzyladenine) 及真菌抽出物 (Fungal elicitor) 等，對澱粉酶之誘導作用，以明瞭細胞對環境刺激之可能反應模式。

材料與方法

藥品及材料

Potato Starch, Sucrose, Glucose 購自 Merck, Germany。Starch azure, Benzyladenine, Gibberellin,

3,5-Dinitrosalicylic acid, Anthrone 購自 Sigma, MO, USA。水稻細胞 (*Oryza sativa* cv. Taipei 309) 由中央研究院分子生物研究所余淑美博士提供。

細胞培養及數目測定

以 MS 液態培養基培養水稻細胞是根據 Kuo (1990) 的方法，在 50ml 培養基接種約 0.3 克細胞，置 150rpm 振盪條件下生長，溫度為 30°C，光周期為 14 小時光照，10 小時黑暗。測定細胞數目時，將培養液振盪使呈均勻懸浮時，取出 0.5ml 細胞培養液並稀釋至 10ml。然後取 50 μ l 稀釋液置血球計數器玻片上，在 100 倍顯微放大下計算 1mm 方格中的細胞數目。每一懸浮液細胞之測定皆重複三次，取其平均值。

真菌抽出物 (Elicitor) 之製備

以水稻紋枯病 (*Rhizoctonia solani*) 菌絲接種在 potato dextrose agar 培養基上，在 25°C 下培養 7 天。真菌抽出物製作是參考 Kombrink 及 Hahlbrock (1986) 之方法，取一塊含菌絲體的培養基在無菌狀態下移至 V8 液態培養基中，再以 25°C，120rpm 振盪培養 14 天。收集含菌絲之培養液，離心 (8000xg) 15 分鐘，倒除上清液，並重複兩次以蒸餾水清洗菌絲團。加入 100ml 蒸餾水並振盪菌絲團使懸浮，然後進行高壓滅菌。滅菌後的菌液，用離心法 (8000xg, 15 分鐘) 去除菌絲，收集上清液再高壓滅菌。滅菌後的上清

液置4°C冷藏備用。

酵素活性之測定

α -澱粉酶活性測定是依Doeh-
lert and Duke(1983)的方法；在0.4ml
含2% Starch azure, 3mM CaCl₂之
100mM potassium Succinate buffer
(pH 6.8)中加入0.2ml測定液，均勻
混合後在30°C反應30分鐘。以0.6ml
之20%TCA停止其反應，離心
(2800xg)20分鐘，取上清液於波長
595nm下測定吸光值，設10A/hr爲一
活性單位(unit)。

β -澱粉酶活性測定是根據
Dure(1960)方法；在0.4ml含2%
Potato Starch, 1mM EDTA之So-
dium acetate buffer(pH 3.6)中加入0.2
ml測定液，均勻混合後在30°C反應
反應30分鐘。取0.2ml反應後溶液和
0.1ml dinitrosalicylic acid試劑充分混
合，在沸水中加熱5分鐘，俟冷卻後
加入2ml蒸餾水，均勻混合後在波長
540nm下測定吸光值。以產生mmol
maltose/min 爲一活性單位。

細胞之萃取是取2g細胞加入
1ml之0.2 M phosphate buffer(pH7.0)
或0.2M Borate buffer(pH8.8)0.1g不
溶性的Polyvinylpyrrolidone及0.1 g石
英砂在冰浴研鉢中將細胞磨碎，經
8000xg離心30分鐘後，上清液用於
酶活性測定。

過氧化酶活性測定是依Gove及
Hoyle(1975)的方法；反應溶液含
5ml之0.2m phosphate buffer(pH7.0)
及1ml 0.02M Guaiacol，加入0.1ml萃
取液於30°C反應20分鐘。然後再加

入0.5ml之0.1%H₂O₂迅速混合後，在
波長470nm下測定1分鐘內吸光值之
改變速率。設1.0A/min爲一活性單
位。

苯丙胺酸去胺酶活性測定則採
用Schopfer和Mohr(1972)的方法；混
合0.75ml之0.05M L-Phenylalanine及
1.5ml之0.2M Borate buffer(pH8.8)成
爲反應溶液，加入1.0 ml酶測定液均
勻混合後，在25°C反應6小時，然後
在波長290nm下測吸光值。設1.0
A/hr爲一活性單位。

蛋白質及含糖量之測定

細胞萃取液中可溶性蛋白質含
量是以Comassie brilliant blue G-250
試劑加以測定(Bradford, 1976)。培
養基中的含糖量是以0.2% Authrone-
硫酸試劑測定之。並分別以glucose
及Sucrose作標準曲線用於換算。

結 果

水稻細胞在懸浮培養過程中，
細胞的生長狀況可以從鮮重、乾重
及細胞數目的增高爲指標而觀察
到。細胞的生長在第七天達到高
峰，此後便逐漸趨於老化。吉貝素
(Gibberellin)及細胞分裂素(Benzyl-
adenine)的處理，會增快細胞的生
長，但並不能延遲細胞的老化，甚
至有加速老化的傾向(圖一A)。

培養基中所含的蔗糖爲供給細
胞生長的主要碳源。雖然細胞是在
光/暗週期下生長，但並無光合機構
的分化，故細胞生長所需能量都得

依賴培養基的碳源供應。圖一B顯示吉貝素或細胞分裂素的添加，會增快細胞消耗碳源。可能是植物調節素能刺激細胞，使細胞的代謝加快，而導致生長加快，老化也增快之結果。

培養基中 α -澱粉酶活性會隨著細胞的生長而逐漸增高。吉貝素或細胞分裂素卻能明顯誘導酶的合成及釋出，尤其在第五天碳源祇剩約三分之一時，活性的增高更加顯著(圖一C)。活性的增高一直到第九天，即細胞趨向老化時，才緩和下來。 β -澱粉酶活性也一樣會受吉貝素及細胞分裂素的誘導(圖一D)。然而酶活性的增高呈等速狀態增加，並不像 α -澱粉酶活性誘導所呈現兩階段曲線。此結果顯示 α -澱粉酶的誘導和培養基中碳源的匱乏較為相關。相對地， β -澱粉酶活性的增高，則可能關係到細胞的代謝活性，直到細胞逐漸老化時，才終止誘導。此外，我們的結果也顯示出無論是對 α -或 β -澱粉酶，吉貝素的誘導作用都比細胞分裂素顯著。

如果以最簡單的有機碳源，葡萄糖替代培養基中的蔗糖，並不影響細胞的生長，反有稍為加快的作用。添加細胞生長素也能有效地促進細胞生長(圖二A)，並在第五天就達到生長高峰。從葡萄糖的快速消耗及生長的增快，顯示細胞分裂素可促進細胞的代謝，培養基中的葡萄糖到第七天就已消殆盡，而此時MS培養基中的蔗糖仍有約35%的存量(圖二B)。對水稻細胞的生長，葡

萄糖取代蔗糖並不會抑制澱粉酶的釋出，反而有小幅度的促進作用(圖二C、D)。在細胞分裂素的誘導下， α -澱粉酶活性在一天以後才能急速增高，而 β -澱粉酶活性增高反應較 α -澱粉酶快速。在第七天碳源用盡時，酶活性則呈現另一階段的促進作用。

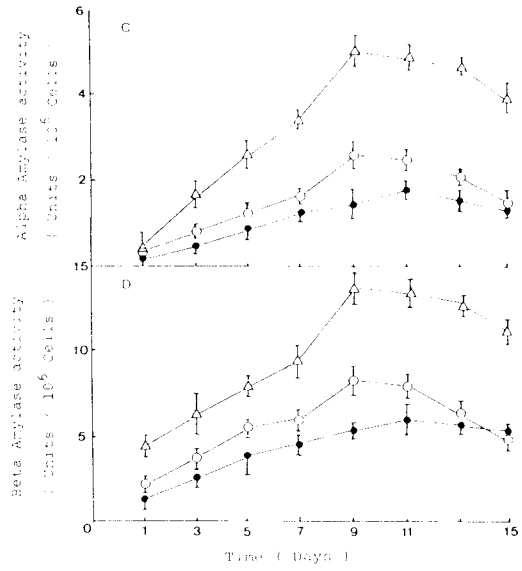
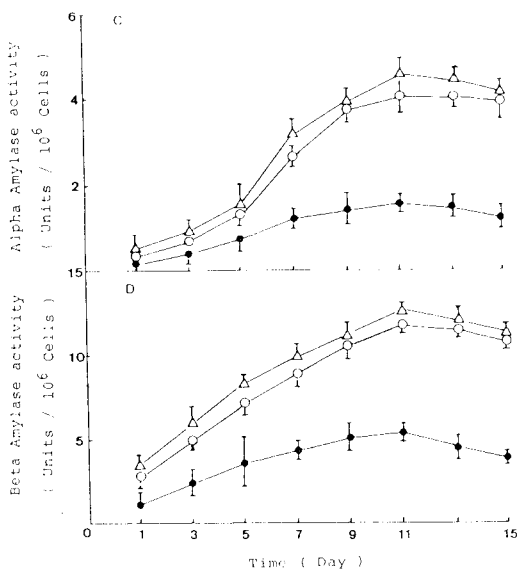
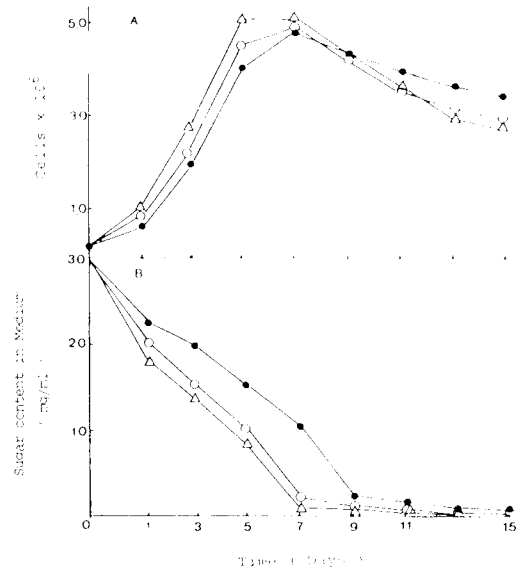
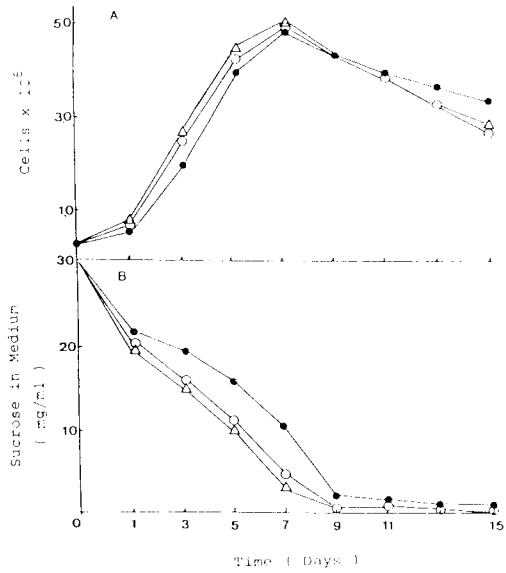
真菌*Rhizoctonia solani*之抽出物預期可以誘導細胞的防禦反應。從實驗結果可以觀察到真菌抽出物的處理，並不會抑制細胞的生長(圖三A)，但會促進細胞對培養基中的碳源收吸及消耗，顯示真菌抽出物的刺激造成細胞代謝的加強(圖三B)。圖三C、D顯示真菌抽出物可以誘導 α -及 β -澱粉酶的合成及釋出。從處理一天之後，酶活性就開始增高，這種酶活性的誘導可持續到第十一天才停止。從酶活性誘導曲線來看， α -及 β -澱粉酶的釋出可能在細胞的防禦機制中，所產生的同步反應。

真菌抽出物的刺激，除了誘導澱粉酶的釋出外，對於細胞代謝作用的影響，則可藉一些細胞內易於反應環境變動的酵素，如過氧化酶和苯丙胺酸去胺酶的活性變化來加以觀察。在細胞生長期間，真菌抽出物的處理可以促進過氧化酶專一性活性的增高(圖四A)。從處理的第一天開始酶活性就有兩倍，且可一直維持到第七天。

苯丙胺酸去胺酶為phenylpropanoid代謝徑路的關鍵酶，能靈敏地反應環境因子的刺激。例如紫

外光照射就可誘導酶活性的增高。同樣地，真菌抽出物的處理也有效地刺激酶活性的增高，且隨著細胞的生長呈直線型增高(圖四B)。顯示

真菌抽出物對苯丙胺酸去胺酶的活性誘導效果，並不遜於紫外光的誘導。



圖一、吉貝素、細胞分裂素對水稻細胞之生長及培養基中澱粉酶活性之影響。

- 表MS培養基
- 表含10 μ M細胞分裂素之MS培養基
- △—△ 表含10 μ M吉貝素之MS培養基

圖二、葡萄糖、細胞分裂素對水稻生長及培養基中澱粉酶活性之影響

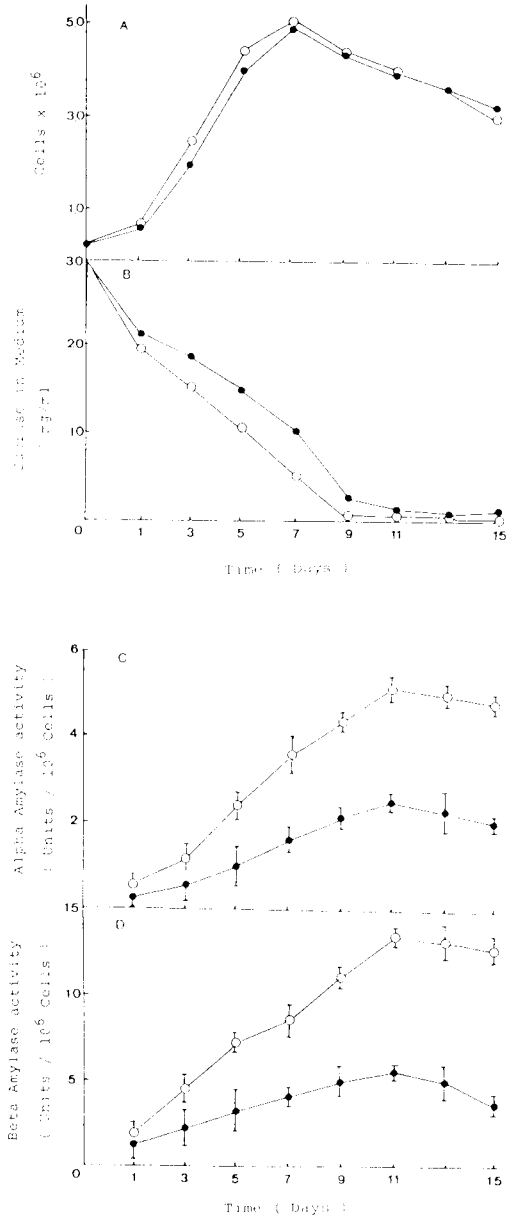
- 表MS培養基
- 表以葡萄糖取代蔗糖之MS培養基
- △—△ 表含10 μ M細胞分裂素，且葡萄糖取代蔗糖之MS培養基

討 論

在初步實驗中，曾對水稻品系，台北 309、台南5號及台農等細

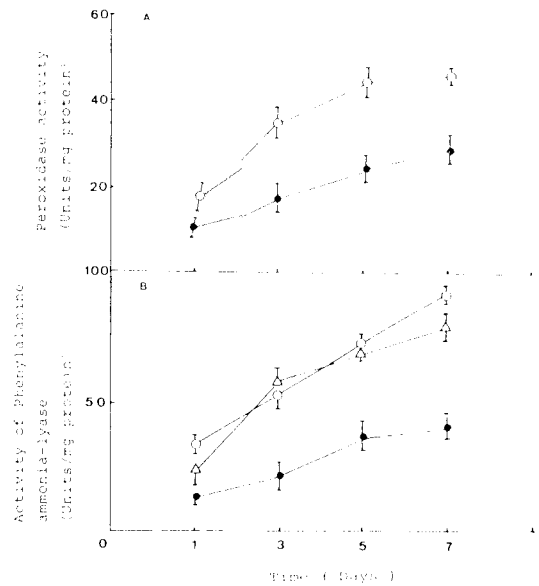
胞測試其對環境因子刺激之反應。結果是大同小異，顯示品系間的遺傳差異並不會明顯地反應在環境因子變異。因此所有實驗皆以台北309品系為材料。

吉貝素已是公認可促進植物種子之萌發，從早期離體糊粉層細胞 α -澱粉酶之誘導研究(Goodwin and Carr, 1972)，到最近證實這種誘導是促進基因表現，而提高了mRNA的產量(O'Neill *et al.*, 1990)。 α -澱粉酶基因能否在細胞未分化時，就可被吉貝素誘導，還是細胞經過分化後才能被吉貝素誘導呢？從實驗結果顯示，無論是 α -或 β -澱粉酶的合成及釋出，都會受吉貝素的處



圖三、真菌抽出物對水稻細胞生長及培養基中澱粉酶活性之影響

● ● 表MS培養基
○ ○ 表加有真菌抽出物之MS培養基



圖四、真菌抽出物對細胞內過氧化酶、苯丙胺酸去胺酶活性之誘導

● ● 表MS培養基
○ ○ 表加有真菌抽出物之MS培養基
△ △ 表MS培養基培養之細胞，在萃取前以紫外光處理兩小時

理而促進。當然這種酶活性的增高，是否為基因表現之反應，則還需要有mRNA含量之觀察方可確定。

細胞分裂素為組織培養所必需的植物調節素，也可延遲組織、細胞之老化。在大麥白化葉片的觀察， $10 \mu\text{M}$ benzyladenine 可以誘導 nitrate reductase 活性增高及其mRNA的堆積(Lu *et al.*, 1992)。菸草細胞的研究也確定Benzyladenine 可以誘導基因的表現 (Dominov *et al.*, 1992)。benzyladenine 的處理同樣可以誘導水稻細胞 α -及 β -澱粉酶之合成及釋出，其酶活性誘導曲線和吉貝素的誘導相類似。

真菌抽出物能誘發植物組織、細胞之防禦反應；接種有verticillium albo-atrum 之蕃茄細胞，其苯丙胺酸去胺酶活性會被誘導而急劇升高 (Mark and Brian, 1991)。即使非寄生性的酵母菌抽出物，亦能有效地刺激Orthosiphon 細胞合成苯丙胺酸去胺酶而導致Rosmarinic acid 之堆積 (Sumaryono *et al.*, 1991)。真菌抽出物除了能明顯誘導水稻細胞 α -及 β -澱粉酶之合成及釋出外，細胞內的過氧化酶及苯丙胺酸去胺酶也是同樣被誘導而活性增高。過氧化酶為寬受質的酵素，普遍存在植物界，雖然酶的生理功能仍未完全確定，但在豆科植物(cluster bean)、玉米及瓜類植物都曾證實過氧化酶和植物組織的防禦反應有所關聯 (Singh *et al.*, 1990; Shimoni *et al.*, 1991)。

從水稻細胞的生長及其對碳源的消耗情況來說，吉貝素、細胞分裂素及真菌抽出物的處理並不會抑制細胞的生長，反而有促進生長的作用。顯示這些環境因子的刺激，促使細胞的代謝加快，以配合一些可被誘導的基因表現。

雖然利用酶的物理、化學性質之差異，分別測定 α -及 β -澱粉酶活性。但由於二酶活性誘導曲線相當類似，有可能是因酶活性測定重疊性所致。但從二酶的作用產物分析結果(未出示)，顯示二者相互干擾性並不明顯。如果要完全排除活性測定之可能重疊，則必須進一步純化酶分子來加以證實。

根據這些實驗結果，我們認為未分化的細胞能更為廣泛地反應環境因子的刺激。因為它們是以單一細胞狀態存在，個別獨立而無分工。反之，細胞在分化過程中，就可能喪失部分的反應能力。分化細胞的這種反應專一性，才更能適合分工的多細胞機體之生理需要。

參考文獻

- Bilderback, D. E. 1975. A simple method to differentiate between α - and β -amylase. *Plant Physiol.* 51:594-595
- Bradford, M. 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.

- Dochlert, E. C., and S. H. Duke. 1983. Specific determination of α - amylase activity in crude plant extracts containing β -amylase. *Plant Physiol.* **71**:229-234.
- Dominov, J. A., L. Stenzler, S. Lee, J. J. Schwarz, S. Leisner, and S. H. Howell. 1992. Cytokinins and auxins control the expression of a gene in *Nicotiana plumbaginifolia* cells by feedback regulation. *The Plant Cell* **4**:451-461.
- Dure, L. S. 1960. Site of origin and extent of activity of amylase in maize germination. *Plant Physiol.* **35**:925-934.
- Goodwin, P. B., and D. J. Carr. 1972. The induction of amylase synthesis in barley aleurone layers by gibberellic acid: II. Timing of the requirement for iron and calcium ions. *J. Exp. Bot.* **23**: 8-13.
- Gove, J. P., and M. C. Hoyle. 1975. The isozymic similarity of indole acetic acid oxidase to peroxidase in birch and horseradish. *Plant Physiol.* **56**:684-687.
- Hardie, D. C. 1975. Control of carbohydrate formation by gibberellic acid on barley endosperm. *Phytochem.* **14**:1719-1722.
- Ho, T. H. D., R. C. Nolan, L. S. Lin, M. R. Brodl, and P. H. Brown. 1987. Regulation of gene expression in barley aleurone layers. In "Mol. Biol. Plant Growth Control" pp 35-49.
- Kombrink, E., and K. Hahlbrock. 1986. Responses of cultured parsley cells to elicitors from phytopathogenic fungi. Timing and dose dependency of elicitor induced reactions. *Plant Physiol.* **81**:216-221.
- Kuo, Y. H. 1990. Regulation of α -amylase gene expression by sucrose starvation in the suspension-cultured rice cells. N.T.U. Master Thesis.
- Lu, J. L., J. R. Ertl, and C. M. Chen. 1992. Transcriptional regulation of nitrate reductase mRNA levels by cytokinin-abscisic acid interactions in etiolated barley leaves. *Plant Physiol.* **98**: 1255-1260.
- Mark, A. B., and E. E. Brian. 1991. Phenylalanine ammonia-lyase from tomato cell cultures inoculated with *Verticillium albo-atrum*. *Plant Physiol.* **97**:1494-1500.
- Okamoto, o., and T. Akazawa. 1980. Enzymic mechanism of starch breakdown in germinating rice seeds 9: de novo synthesis of β - amylase. *Plant Physiol.* **65**: 81-84.
- O'Neill, S. D., M. H. Kumagai, N. Huang, R. D. Sutliff, and R. L. Rodriguez. 1990. The α -amylase gene in *Oryza sativa*: Characterization of cDNA clones and mRNA expression during seed germination. *Mol. Gen. Genet.* **221**: 235-244.
- Schopfer, P., and H. Mohr. 1972. Phytochrome-mediated induction of phenylalanine ammonia-lyase in mustard seedlings: A contribution to eliminate some misconceptions. *Plant Physiol.* **49**:8-10.
- Sharma, R., and P. Schopfer. 1982. Sequential control of phytochrome-mediated synthesis de novo of β -amylase in the cotyledons of mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. *Planta* **155**:183-189.
- Shewry, P. R., S. Parmar, B. Buxton, M. D. Gale, C. J. Lin, J. Heigard, and M. Kreis. 1988. Multiple molecular forms of α - amylase in seeds and vegetative tissues of barley. *Planta* **176**:127-134.
- Shimoni, M., A. Bar Zur, and R. Reuveni. 1991. The association of peroxidase activity and resistance of maize to *Exserohilum turcicum*. *J. Phytopathol.* **131(4)**:315-321.
- Singh, J. V., M. L. Saini, S. K. Arora, V. P. Singh, and S. K. Gandhi. 1990. Relationship between bacterial blight severity and biochemical parameters in clusterbean (*Cyamopsis tetragonoloba*). *Anal. Biol.* **6(2)**: 117-122.
- Smith, J. A., R. Hammerschmidt, and D. W. Fulbright. 1991. Rapid induce of systemic resistance in cucumber by *Pseudomonas*

- syringae* pathovar *syringae*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **38**(3):223-235.
- Subbaramaiah, K., and S. Sharma. 1989. β -amylase from mustard (*Sinapis alba* L.) cotyledons. *Plant Physiol.* **89**:860-866.
- Sumaryono, W., P. Proksch, T. Hartmann, M. Nimtz, and V. Wray. 1991. Induction of rosmarinic acid accumulation in cell suspension cultures of *Orthosiphon aristatus* after treatment with yeast extract. *Phytochem.* **30**:3267-3271.
- Yu, S. M., Y. H. Kuo, G. Sheu, Y. J. Sheu, and L. F. Liu. 1991. Metabolic derepression of α -amylase gene expression in suspension-cultured cells of rice. *J. Biol. Chem.* **266**:21131-21137.

Induction of Amylase by Gibberellin, Benzyladenine, and Fungal Elicitor in Suspension-Cultured Rice Cells

Rui-Chi Chou and Wu-Fu Tong

Department of Biology
National Taiwan Normal University

ABSTRACT

Responses of cultured rice cells to the changes of environmental condition were investigated. Cell growth was promoted by addition of either gibberellin or benzyladenine to 10 μ M, but neither growth regulator could prevent cells from being senescent. The biosynthesis and secretion of α - and β -amylase could also be induced by treatment of the two phytohormones, and between them gibberellin appeared to be more effective than benzyladenine. Replacement of sucrose by glucose as the main carbon nutrient could not diminish the inductive effect of the phytohormones. These results indicate that gibberellin and benzyladenine are able to cause cell growth and biosynthesis of amylases. Treatment of fungal elicitor also stimulated rice cells to secrete more amylases and, in addition, caused an increase of the activities of peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in the cell. It is concluded that the expression of certain genes concerning to the defense mechanism might be induced by treatment of fungal elicitor, from which the metabolic activity of cells are elevated.

Key words: rice cells, amylase induction