

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

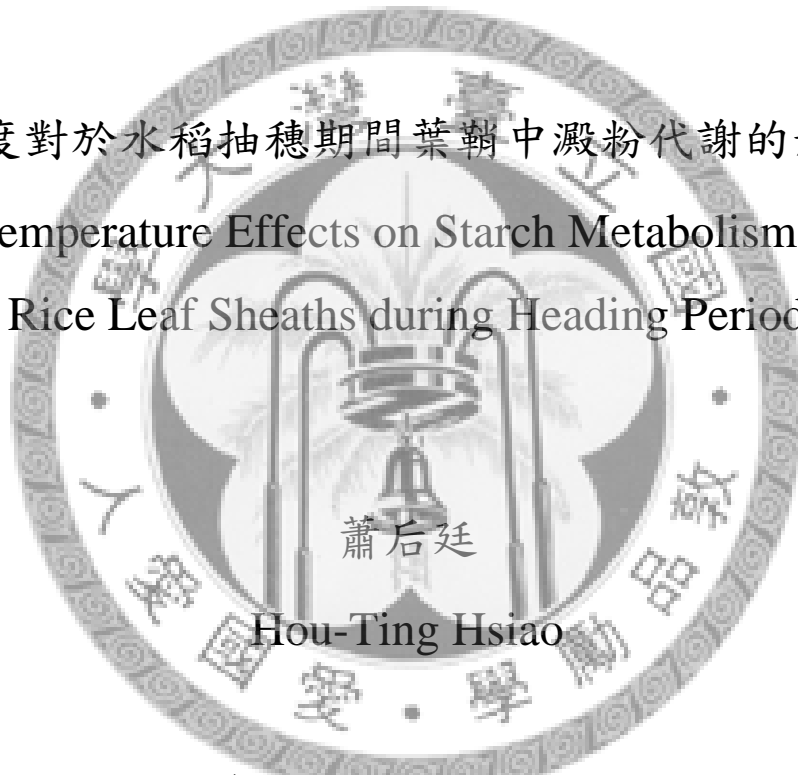
College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

溫度對於水稻抽穗期間葉鞘中澱粉代謝的影響

Temperature Effects on Starch Metabolism in
Rice Leaf Sheaths during Heading Period



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

致謝

開始念研究所或許真的是我這一生的轉捩點。

這幾年，從對研生活感到緊張、害怕，到有明確的目標，這漫長過程能夠到此開花結果，必須感謝許多人的幫助及建議。沒有這些，不會有現在的我。

特別感謝王淑珍老師在這些年當中對我的指導與容忍，在我對方向感到疑惑時沒有放棄並一次次的將我從失敗的洞中拉起來，並在我對實驗結果感到困惑時，給我另一個思考的角度使我對自己的實驗有信心。而劉麗飛老師亦在當我心靈上遭遇到挫折時，不吝於給予加油與打氣，使我能夠重新回到光明面來看待所遭遇的問題。感謝張孟基老師與洪傳揚老師在與我們討論實驗時，提供不同的角度與方向來引導我們解讀我們的研究，讓我的思考能夠更加多元。

除了各位老師的諄諄教誨之外，實驗室的各位夥伴與各位朋友們亦是我在研究生涯中的支柱。懷如學姐與雲洋學長兩位大前輩在實驗、研究生的心態等各方面的經驗分享；家豪、柏宏、焯輝、聖善、芊卉、彥萱等好友們互相的關心與砥礪；佳宜、維怡給我的鼓勵與榜樣；祥霖、佳勳、蕭蔚、啟光、泳傑等學弟妹們在實驗上的幫手。還有劉阿姨在這些年來給予實驗室的支援與幫助。這些一切的一切都是我求學過程中的重要資產，在這裡我必須對各位陪伴我走過這幾年的朋友們致上我最誠摯的感謝。

最後，感謝我的家人們。你們對我的擔心與焦慮的心情，都是發自於父母對子女的關心。雖然當學校生活與家庭生活兩方的矛盾互相碰觸時，偶而會發生一些小衝突。但是我也知道這一切都是起因於自己在處理事情上的不成熟。在此對我的父母感到深深地抱歉，也謝謝你們能等到我論文的完成，僅以此論文獻與我的父母，也希望你們能夠健康。

后廷 2009年夏

目錄

目錄	I
圖表目錄.....	IV
中文摘要.....	V
英文摘要.....	VI
前言	1
1. 暫存於水稻營養組織中碳水化合物之移轉.....	1
2. 澱粉生合成與代謝酵素之簡介.....	1
3. 水稻暫存性澱粉之代謝於抽穗期間的調控機制.....	2
4. 環境因子對於暫存性碳水化合物代謝之影響.....	3
4.1. 缺水環境對暫存性碳水化合物代謝之影響.....	4
4.2. 溫度變化對於穀類作物生產之影響.....	4
4.2.1. 高溫下對穀粒發育之影響.....	5
4.2.2. 高溫下穀類作物葉片光合作用之影響.....	5
4.2.3. 高溫下穀類作物營養組織中暫存性碳水化合物對產量影響.....	5
4.2.4. 探討植物在不同溫度下各澱粉主要代謝酵素反應之研究.....	6
5. 本論文之研究主題.....	7
材料與方法.....	8
1. 植物材料.....	8
2. 水稻種子發芽與栽培.....	8
3. 溫度處理.....	8
4. 取樣.....	9
5. 蛋白質萃取與定量.....	10

6. Soluble starch synthase 活性分析	11
7. Granule-bound starch synthase 活性分析	12
8. 澱粉含量分析	13
9. 可溶性醣類含量分析	14
10. α -Amylase之活性分析	14
11. β -Amylase之活性分析	16
結果	18
1. 抽穗前葉鞘中非結構性碳水化合物之代謝	18
1.1. 溫度影響葉鞘中澱粉之累積	18
1.2. 溫度影響葉鞘中可溶性醣類之含量	18
1.3. 溫度處理下之蛋白質含量與各澱粉生合成酵素之活性	19
2. 抽穗後溫度對穀粒充實與葉鞘中澱粉代謝之影響	19
2.1. 各種溫度處理下水稻穀粒充實之差異	19
2.2. 各溫度處理下抽穗後葉鞘澱粉降解過程的改變	20
2.3. 溫度處理下葉鞘中澱粉水解酵素活性之變化	20
討論	22
1. 水稻抽穗期的劃分與實驗設計	22
2. 各溫度處理下葉鞘中非結構性碳水化合物累積之差異	22
3. 溫度對於葉鞘澱粉生合成酶之酵素活性的影響	23
4. 抽穗後葉鞘中澱粉的降解過程受溫度之影響	24
5. 結論與未來展望	24
參考文獻	26
附錄一	39

附錄二 40

附錄三 41

附錄四 42



圖表目錄

圖一、溫度對於抽穗前-2葉葉鞘澱粉含量變化之影響.....	32
圖二、溫度對於抽穗前-2葉葉鞘中可溶性醣類含量之影響.....	33
圖三、溫度對於抽穗前-2葉葉鞘中澱粉合成酶酵素活性之影響.....	34
圖四、溫度對於抽穗前-2葉葉鞘中蛋白質含量變化之影響.....	35
圖五、溫度對於抽穗後穀粒充實與充實速率之影響.....	36
圖六、溫度對抽穗後-2葉葉鞘中澱粉含量變化之影響.....	37
圖七、溫度對於抽穗後-2葉葉鞘澱粉水解酵素活性之影響.....	38



中文摘要

水稻在抽穗期前於葉鞘中累積的暫存性碳水化合物，於抽穗後會成為提供給穀粒充實的碳源之一。此外，葉鞘中的暫存性碳水化合物亦是於輕微的缺水逆境下使穀粒充實速度提高的碳供應源。水稻穀粒充實速度隨著溫度的提高而增加，為瞭解此時穀粒充實速度是否與葉鞘作為碳源供應有關，因此我們分析溫度對抽穗時期水稻葉鞘中澱粉代謝之影響。本論文將水稻分別於抽穗前與抽穗後兩個時期，並置於高溫(35/30°C)、低溫(15/13°C)與對照組(25/20°C)之溫室中，分別探討溫度對抽穗前葉鞘中澱粉累積之影響與抽穗後溫度對葉鞘提供碳水化合物能力的影響。在對照組(25/20°C)下，大多數的非結構性碳水化合物以澱粉的形式累積於葉鞘中。而低溫處理(15/13°C)下，葉鞘中的澱粉含量只有對照組的81.1%，但可溶性醣類含量則為對照組的171.8%。此外，高溫處理下(35/30°C)，葉鞘中的澱粉與可溶性醣類含量相較於對照組減少許多，推測高溫下大量的同化物質被消耗。澱粉生合成酵素活性分析中SSS與GBSS在各溫度處理間的差異並不顯著，因此推測葉鞘中澱粉累積在高溫下較低，可能並非是因澱粉合成酶活性下降所造成。抽穗後高溫下葉鞘中的澱粉降解速度比25/20°C慢，而分析葉鞘中澱粉水解酵素 α -amylase與 β -amylase之活性，發現其酵素活性於高溫下沒有比對照組來得高，顯示葉鞘中澱粉降解速率並不會隨著溫度的提高，增加提供碳源至穀粒的速度。

關鍵字：水稻 積儲-供源轉換 高溫 葉鞘 澱粉

英文摘要

The temporal carbohydrate accumulated in leaf sheaths is an important carbon source during grain filling. Besides that, the temporal carbohydrate in leaf sheath also acculturate the grain filling rate when the rice subject moderate water stress. High temperature also acculturate the grain filling rate. In order to understanding the correlation between the grain filling rate and the carbohydrate supplying rate from leaf sheath . We analysis the temperature effects on starch metabolism in leaf sheath during heading period. My research was focused on the temperature effect on starch accumulation in leaf sheaths before heading and starch degradation in leaf sheaths at post-heading stage. The temperature that we treated on rice plants were 35/30°C, 25/20°C, and 15/13°C, respectively. Under the control condition, starch was rapidly accumulated in leaf sheaths during pre-heading period. Under lower temperature (15/13°C),the starch content in leaf sheaths was only 81.1% that in 25/20°C-treated rice plants (control plants), however the soluble sugar content was 171.8% that in control plants. On the other hand, high temperature treatment reduced both starch and soluble sugars content in leaf sheaths compared with control plants. We suggest that the plant lost a lot of assimilates under high temperature during treatment period. Since the GBSS and SSS activities were similar in leaf sheaths under different temperature treatment, the reduce of starch contents in high temperature-treated plants was not caused by starch synthase activities repressing. During post-heading period, the starch degradation rate is slower than that in 25/20°C, and the result showed that the amylase activities also didn't higher than in 25/20°C. Therefore, the starch degradation rate in leaf sheath will not be accelerated by high temperature, and accelerate the carbon source supply to grain filling.

Key words: rice, sink-source transition, high temperature, leaf sheath, starch



前言

1. 暫存於水稻營養組織中碳水化合物之移轉

水稻(*Oryza sativa* L.)在生長的過程中，會在其莖稈與葉鞘中累積以澱粉為主的非結構性碳水化合物。並隨著植株的成長，其中所累積的澱粉含量會漸漸的增加，並於抽穗前後達到最大累積量(Perez et al., 1971)。當水稻抽穗授粉後，隨著穀粒的發育與充實，先前在莖稈與葉鞘中累積的澱粉即會漸漸分解，並運送至穀粒中成為穀粒充實時部份碳水化合物來源(Perez et al., 1971; Cock and Yoshida, 1972)。莖稈與葉鞘由原本貯存累積澱粉的角色轉換為提供碳水化合物給穀粒的功能，我們稱為積存-供源的轉換(sink-source transition)。在此，我們稱呼抽穗前在莖稈與葉鞘中所累積的碳水化合物為暫存性碳水化合物(temporal sink carbohydrate)，而存放這些暫存性碳水化合物的植物組織，則稱之為暫存性組織(temporal sink tissue)。1972年，Cock與Yoshida將標記有 ^{14}C 的 CO_2 提供給IR8水稻品種進行同化作用，藉由追蹤穀粒充實過程中碳水化合物的轉運，推算出自莖稈與葉鞘所提供至穀粒之碳水化合物，約佔水稻穀粒充實所需碳源之30%。且分析水稻幼穗形成期非構造性碳水化合物(nonstructural carbohydrate, NSC)累積量與最終收穫產量發現兩者間有極顯著的正相關性(Ishikawa et al., 1993)，顯示抽穗前莖稈與葉鞘中暫存性碳水化合物越多，則所收穫的產量就越高。

2. 澱粉生合成與代謝酵素之簡介

澱粉主要是由無數的glucose互相以 α -1,4 (將glucose串聯成直鏈構造)與 α -1,6 (形成分子中的分支)兩種鍵結形式組合而成的巨大分子。根據這兩種鍵結形式的比例，可以區分出以直鏈分子為主的直鏈澱粉(amylose)與分支較多的支鏈澱粉(amylopectin)。在澱粉生合成的過程中，首先透過了ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase)將glucose-1-phosphate與ATP合成ADP-glucose以做為合成澱粉的單元前驅

物。AGPase的活性會受到3-phosphoglyceric acid (3PGA)的影響提高，而磷酸根離子(Pi)則會抑制其活性(Ghosh and Preiss, 1966; Sikka et al., 2001)。在植物體中則藉著反應3PGA/Pi的平衡，進行澱粉生合成的調控(Sikka et al., 2001)。接著，starch synthase再進一步的將ADP-glucose接上(glucose)_n來延長glucose的聚合分子。其中starch synthase又可依其特性，區分為主要合成直鏈澱粉的granule-bound starch synthase (GBSS)與支鏈澱粉的soluble starch synthase (SSS)。另外starch branching enzyme則是將 α -1,4鍵結切斷並轉換為 α -1,6鍵結，將原本的直鏈澱粉轉換為支鏈澱粉，屬於分子構造上的轉換。

在澱粉分解方面，與穀粒、塊根或塊莖等貯存器官不同，葉片中的澱粉代謝並非單純且長時間的累積或分解細胞中的澱粉，而是處於一個快速、動態的累積與分解過程中(Smith et al., 2003)。當葉片處於黑暗中準備開始降解澱粉時，澱粉粒首先會依序被glucan-water dikinase (GWD，或是被稱為RI)、phosphoglucon-water dikinase (PWD)等酵素給磷酸化(Ritte et al., 2002; Mikkelsen et al., 2004; Baunsgaard et al., 2005; Kötting et al., 2005; Lloyd et al., 2005)。Lloyd等人(2005)推測藉由澱粉磷酸化後澱粉粒表面親水性的提高，有利於澱粉水解酵素對澱粉粒的作用。而在澱粉水解酵素方面，主要有 α -amylase、 β -amylase、isoamylase、pullulanase等各種水解酵素，其中 α -amylase為澱粉內切酵素，以水解 α -1,4的鍵結為反應目標，一般認為是澱粉貯藏組織中澱粉水解的主要酵素，但其在葉片澱粉水解過程的相關證據仍較缺乏(Lloyd et al., 2005)。而 β -amylase為澱粉外切水解酵素，將glucan中的 α -1,4鍵結水解成為maltose。目前有較多可靠的證據證明 β -amylase在葉片中澱粉降解有直接的影響(Lao et al., 1999; Critchley et al., 2001; Niittylä et al., 2004; Weise et al., 2004)。而isoamylase與pullulanase等酵素則是負責glucan中 α -1,6鍵結的水解，因此亦被稱之為debranching enzymes。

3. 水稻暫存性澱粉之代謝於抽穗期間的調控機制

近年來，越來越多的研究著重於抽穗前在水稻營養組織中所預先累積的碳水化合物在水稻抽穗時期的代謝與轉移。水稻各節位葉片的葉鞘，越靠近上部節位葉片的葉鞘所累積的澱粉含量越多，且於抽穗後澱粉含量降解越是明顯(Watanabe et al., 1997)。此一現象，本實驗室亦於先前對水稻台農67號(TNG67)各上位葉鞘的澱粉含量分析，證實位在劍葉下第二片葉片之葉鞘(-2 leaf sheath)於水稻抽穗期間之sink-source transition現象最為明顯(Chen and Wang, 2008)。Watanabe等人(1997)進一步的測定於水稻抽穗時期，上位葉鞘中參與澱粉生合成的各種酵素之活性與澱粉含量變化的相關性，發現SBE、GBSS之活性變化與澱粉含量的變化具有極顯著的正相關性，而SSS與質體中的fructose-1,6-bisphosphatease (FBPase)也有顯著的正相關性，顯示水稻在抽穗前透過葉鞘中這些酵素的調控，並累積大量的澱粉。除了酵素活性的分析以外，水稻抽穗前-2葉鞘中AGPase、SSS、SBE等基因表現量達到最高的時期，也是-2葉鞘中澱粉累積速度最快的時期(Hirose et al., 1999)。本實驗室先前發表利用real-time RT-PCR檢測台農67號水稻-2葉鞘中，澱粉生合成相關之基因族群(gene family)的表現與澱粉含量變化於抽穗期間的相關性，更詳細的發現AGPase large subunit 2、GBSSII、SSSI、SBEI、SBEIII、SBEIV等基因表現與澱粉含量的變化都有顯著性的相關(Chen and Wang, 2008)。

而在水稻莖稈與葉鞘中暫存性澱粉的降解研究方面，Hirose等人(1999)針對抽穗期間-2葉鞘中蔗糖生合成與運送酵素的基因表現進行分析，認為sucrose phosphate synthase (SPS)與cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase (cyt. FBPase)在抽穗時期，負責將澱粉分解後的碳源合成蔗糖以進行運送至穀粒中。而在蔗糖運輸的方面，sucrose transporter中OsSUT1與OsSUT4在抽穗後表現量提高，推斷有利於葉鞘中蔗糖的轉運，使得莖稈與葉鞘中的非結構性碳水化合物得以運送至穀粒以提供充實(Chen and Wang, 2008)。

4. 環境因子對於暫存性碳水化合物代謝之影響

4.1. 缺水環境對暫存性碳水化合物代謝之影響

長久以來，農民在水稻授粉充實後，便開始慢慢的降低農地裡的土壤含水量，直到水稻成熟。這樣的農業操作，透過現今的生化與分子生物上的分析，人們得以進一步的瞭解其背後的生理調控機制。水稻與小麥等禾本科作物充實時，若給予輕微的缺水環境，對最終穀粒重量並無顯著的影響，但卻會明顯地縮短穀粒充實的時間。而利用¹⁴C標記莖稈與穀粒中碳水化合物分佈變化的實驗顯示，缺水不僅加速了穀粒的充實速度，亦加速莖稈部位NSC之降解，並加強莖稈中NSC重新分佈至穀粒的速度(Virgona and Barlow, 1991; Yang et al., 2000; Yang et al., 2001; Yang et al., 2004; Yang and Zhang, 2006)。另經酵素分析結果顯示，在輕微缺水的環境處理下，水稻莖稈與葉鞘中 α -amylase、 β -amylase等酵素的活性將被提高。而有關蔗糖代謝相關酵素，雖然莖稈與葉鞘中sucrose synthase並不受到缺水逆境的影響，但SPS則會受到缺水逆境的影響而活性增加(Yang et al., 2001; Yang et al., 2004)。因此，輕微缺水的逆境環境將促進莖稈與葉鞘中暫存性澱粉降解，且合成蔗糖的速度亦加快，故穀粒充實速度提高、穀粒成熟期縮短，以減緩水稻植株在生殖期間受缺水逆境之影響 (Yang and Zhang, 2006)。

4.2. 溫度變化對於穀類作物生產之影響

最近數十年全球平均氣溫不斷升高，除了隨之而來的極端氣候所帶來的災害以外，人們也漸漸開始擔憂溫度提高對糧食生產安全的影響。由分析過去數十年間作物產量變化與全球氣溫變化關聯性的研究指出，隨著作物生產季節的暖化，各種主要穀類作物的產量漸漸降低(Peng et al., 2004; Lobell and Field, 2007)。為了克服溫度上升所帶來的糧食生產災難，許多學者更進一步的探討氣溫變化影響作物產量改變的各種生理機制，如穀粒發育與充實、葉片光合作用效率、同化物質代謝與轉運等方面。

4.2.1. 高溫下對穀粒發育之影響

1991年Tashiro與Wardlaw測定在不同溫度下水稻成熟穀粒的重量，發現當抽穗後溫度處理超過27/22°C(日/夜溫)時，水稻單位穀粒的重量將下降(Tashiro and Wardlaw, 1991)。2005年Morita等人將授粉後的水稻分別處理於高日溫(34/22°C)、高夜溫(22/34°C)與對照組(22/22°C)等三種溫度處理下，並分析各處理下穀粒發育之狀況。發現在高日溫的處理下、其穀粒的最終乾重與對照組相差無幾，但高夜溫處理下的穀粒乾重則與其他兩組相較，減少了9%~10%的穀粒乾重。而在穀粒充實的速度方面，高夜溫下穀粒充實速度較高日溫情況下慢，但無論高日溫或是高夜溫處理，穀粒充實速度都明顯的較對照組來得快，且均比較早達到充實速度的高峰期。因此高溫處理下，穀粒的充實期雖短，但是穀粒增重的速度較快(Morita et al., 2005)。

4.2.2. 高溫下穀類作物葉片光合作用之影響

全球主要穀類作物中，小麥與水稻皆為C3型作物，光合作用速率皆會隨著溫度的提高而提昇，但當溫度超過各自光合作用溫度之臨界值後(水稻之光合作用速率最大值為30~35°C，小麥為25~30°C)，溫度的提高將使光合作用速率降低(Nagai and Makino, 2009)。此外高溫環境也會加速葉片老化，使得葉片中葉綠素大量流失(Blum et al., 1994)。

4.2.3. 高溫下穀類作物營養組織中暫存性碳水化合物對產量影響

Blum等人(1994)分析兩種不同品種的小麥(V2183與V5)在高溫環境下充實的表現時發現，雖然高溫使得兩種品系的小麥穀粒重量皆下降，但是較耐熱的V5品系其穀粒重卻只有下降8%，而V2183品系卻下降了36.4%。進一步的分析其莖稈與葉鞘中的重量與NSC含量，發現V5品系受到高溫的影響，莖稈重量與其中所含NSC之下降速度與幅度皆明顯的較V2183品系高。作者歸納了V5品系較V2183品系耐熱

的因素有下列三項。一、在穀粒充實開始前，V5品系的莖稈乾重比V2183品系的莖稈重。二、在穀粒充實期間，莖稈的乾物重與NSC含量減少的幅度大。三、其穀粒充時期較長。由以上結論，我們可以知道高溫下，莖稈與葉鞘這些營養組織在抽穗前所貯存的暫存性碳水化合物，對於穀粒充實來說是一個非常重要的碳源，特別是處在缺水逆境時，受影響的光合作用無法如正常般提供大量的碳源，使得暫存性碳水化合物提供給穀粒的比例因此提高。

4.2.4. 探討植物在不同溫度下各澱粉主要代謝酵素反應之研究

目前大多數針對高溫下澱粉合成酵素活性之研究主要著眼於禾本科穀粒充實期。在稍早的研究指出，SSS易受到高溫環境的影響而降低活性，但當環境恢復到最適溫度時，其活性會有恢復的趨勢(Hawker and Jenner, 1993; Keeling et al., 1993; Keeling et al., 1994)，但近年亦有報告指出，於高溫處理下小麥穀粒中SSS與GBSS的活性在充實期早期的活性顯著較對照組來得高，直到穀粒充實中後期，高溫下的SSS、GBSS的活性才較對照組來得低(Zhao et al., 2008)。而AGPase與UDP-Glucose pyrophosphorylase (UGPase)等酵素活性則是在高溫下並無顯著的受到影響(Hawker and Jenner, 1993; Keeling et al., 1993)。

而在澱粉降解方面，2004年Kaplan與Guy對阿拉伯芥進行各溫度下的高、低溫刺激處理，以RT-PCR分析 α -amylase與 β -amylase各isogene之表現，發現 α -amylase在25°C時表現量最高，之後隨著溫度提高至40°C時稍稍減弱其表現，當溫度提高到45°C時其表現則十分微弱。而在低溫處理方面， α -amylase的表現量則在10°C與5°C時僅略為增強兩倍。在 β -amylase方面，作者分析了BMY1、BMY7、BMY8、BMY9等四種 β -amylase isogene，發現各種isogene分別表現在不同的溫度處理中，並且與maltose的累積有顯著的相關性。此外透過分析在溫度逆境下，各種不同濃度的醣類對蛋白質與電子傳遞鏈產生的保護作用，作者認為各種不同的溫度下，透過 β -amylase調節maltose的含量，使其能保護植物度過溫度逆境(Kaplan and Guy,

2004)。

5. 本論文之研究主題

穀類作物在抽穗前在莖稈與葉鞘中所累積的暫存性碳水化合物，除了提供作為在一般環境下穀粒充時期重要的碳源之一，當植物遭遇到缺水逆境時，葉片光合作用因受到逆境影響，直接經由光合作用提供碳源至穀粒的能力降低，此時由暫存性碳水化合物供應至穀粒的碳源比例相對提高，並在遭遇逆境前期便加速供應穀粒充實。此一機制也形成一種保護的緩衝作用：提高營養組織內碳水化合物降解之速度以提高穀粒充實速度，並將暴露於逆境下的充實時期縮短，增加子代存活機率。又近年來，隨著全球氣候變遷，作物的生產因此面臨了許多挑戰。其中環境氣溫的增加對作物產量與品質亦漸漸為人們所重視與探討。為進一步瞭解溫度環境對於水稻營養組織中暫存性澱粉代謝之影響，本論文主要以台農67號水稻(*Oryza sativa* L. cv. Tainung 67)位於劍葉下第二片葉片之葉鞘(-2葉鞘)為研究對象，分析水稻抽穗期間於高溫(日/夜溫35/30°C)、低溫(15/13°C)、一般溫度(25/20°C)等環境下，葉鞘中澱粉之含量與其相關代謝酵素活性之改變。

材料與方法

1. 植物材料

高雄農改場提供之94年二期台農67號水稻種子(*Oryza sativa* L. cv. Tainung 67; TNG67)

2. 水稻種子發芽與栽培

- (1) 將TNG67水稻種子，於2.5%次氯酸鈉水溶液浸泡消毒15分鐘後，以大量清水清洗乾淨。
- (2) 將種子襯以吸水紙巾保溼後，平鋪於玻璃培養皿中，並置於37°C黑暗的培養箱中培養兩天。
- (3) 將發芽的種子平鋪於鐵絲網架上，以500 mL燒杯內盛木村氏水耕液^{附錄一}置於日/夜溫分別為25/20°C之生長箱中生長。
- (4) 當幼苗成長至4至5葉齡時進行移植。
 - (4.1) 以單本植於直徑16公分之圓形土盆中。每盆兩株，各植株間距10公分，並放置於戶外網室中，自基肥開始，每盆每月施加2g的台肥有機複合肥2號。
 - (4.2) 以單本植於直徑25公分之圓形土盆中，每盆5株，各植株間距10公分，並放置於戶外網室中，自基肥開始，每盆每月施加3g的台肥有機複合肥2號。
 - (4.3) 單本植於60×35公分之長方形盆中，每盆15株，各植株間距10公分，並放置於戶外網室中，自基肥開始，每盆每月施加12g的台肥有機複合肥2號。

3. 溫度處理

本實驗之溫度處理皆處理於台灣大學生物資源暨農學院附設人工氣候室。

3.1. 溫度處理對抽穗前葉鞘澱粉代謝之影響

- (1) 依據當時氣溫及生長速度計算：測量劍葉葉頸距離下一葉之葉頸11公分時，約為抽穗前六天。
- (2) 選擇生長狀況相似的水稻並標示後，在抽穗前六天之下午兩點至三點間，分別移入日/夜溫為15/13°C、25/20°C、35/30°C之溫室。

3.2. 溫度處理對穀粒充實之影響

- (1) 依據當時氣溫及生長速度計算：測量未抽穗之稻穗頂端距離劍葉葉頸下3公分時，約為抽穗前三天。
- (2) 選擇生長狀況相似的水稻並標記後，在抽穗前三天移入日/夜溫為25/20°C之溫室。
- (3) 當水稻抽穗後，分別移入日/夜溫為35/30、25/20、15/13°C之溫室中。

3.3. 溫度處理對抽穗後葉鞘澱粉代謝之影響

- (1) 選擇生長狀況相似的水稻並標記後，在抽穗前一週移入日/夜溫為25/20°C之溫室。
- (2) 當水稻抽穗後第9天，分別移入日/夜溫為35/30、25/20之溫室中。

4. 取樣

4.1. 溫度處理對抽穗前葉鞘澱粉代謝之影響

- (1) 取樣時間點以開始處理當天為基準，於處理後之0、3、6天之2:00 pm - 3:00 pm 取樣。
- (2) 取樣部位為水稻劍葉下第二葉片之葉鞘(-2 leaf sheath)。
- (3) 取樣並記錄鮮重後以液態氮急速冷凍並保存於-80°C冰箱中。

4.2. 溫度處理對穀粒充實的影響

- (1) 取樣時間點以抽穗當天為基準，於抽穗後0、3、6、9、12天之2:00 pm - 3:00 pm 取樣。
- (2) 稻穗取下後以80°C烘箱烘乾三天。

(3) 將烘乾後的稻穗脫粒，並記錄其平均穀粒重量。

4.3. 溫度處理對抽穗後葉鞘澱粉代謝之影響

(1) 取樣時間點為溫度處理後第1、3、6天之2:00 pm - 3:00 pm取樣。

(2) 取樣部位為水稻劍葉下第二葉片之葉鞘(-2 leaf sheath)。

(3) 為分析-2葉鞘中 α -amylase與 β -amylase之活性，將所取下之-2葉鞘縱剖分成兩半，並記錄其鮮重，液態氮急速冷凍後保存於-80°C冰箱中。

5. 蛋白質萃取與定量

水稻葉鞘蛋白質之萃取參考Nakamura等人(1989)之方法。

(1) 取葉鞘材料在液態氮下以研鉢磨勻後，加入其重量五倍體積之萃取液(100 mM Tricine-NaOH pH 8.0、8 mM MgCl₂、2 mM EDTA、12.5%(v/v) Glycerol、5% (w/v) PVP-40)。

(2) 萃取液在低溫下以miracloth (Cambiochem, Germany)過濾，收集濾液於10 mL離心管中。

(3) 4°C下以10,000 × g離心5分鐘，吸取上清液到新的10 mL離心管。

(4) 上清液

(4.1) 同樣再次於4°C下以10,000 × g離心5分鐘。

(4.2) 吸取更乾淨的上清液至新離心管。

(4.3) 加入4倍體積冰100%丙酮沉澱，並靜置於-20°C下隔夜。

(4.4) 於4°C下以1,300 × g離心15分鐘，去除上清液。

(4.5) 加入1 mL冰80%丙酮清洗，並吸到1.5 mL離心管中。

(4.6) 於4°C下10,000 × g，離心15分鐘，去除上清液。

(4.7) 以1 mL萃取液回溶。

(5) 沈澱物

(5.1) 以5 mL萃取液清洗兩次(10,000 × g，4°C離心5分鐘)以去除可溶性的酵素。

(5.2) 以1 mL的萃取液懸浮沈澱物，以進行GBSS分析。

(6) 蛋白質定量法參考Bradford(1976)之方法。

(6.1) 配製已知濃度的bovine serum albumin (BSA, BioLabs, New England)做為標準曲線。

(6.2) 分別在10 μL 蛋白質萃取液及已知濃度的BSA中加入200 μL 10% Trichloroacetic acid (TCA) 以沈澱蛋白質。

(6.3) 於4°C下以11,337 $\times g$ 離心5分鐘，去除上清液(TCA溶液需回收)。

(6.4) 加入200 μL 0.1 N NaOH溶解沉澱物後，加入600 μL dH_2O 及200 μL Bradford dye (Bio-RAD, USA)。

(6.5) 混合均勻後，測定595 nm下之吸光讀值，並以標準曲線及內插法算出樣品中蛋白質濃度。

6. Soluble starch synthase 活性分析

參考Nishi等人(2001)之方法，實驗原理參考附錄二。

(1) 取 200 μL 粗抽蛋白萃取液(至少含粗蛋白 100 μg)加入 200 μL 反應液一(50 mM HEPES-NaOH pH 7.4、1.6 mM ADP-glucose、0.23% (w/v) Glycogen、16.7 mM DTT)，於 30°C 下作用 30 分鐘。

(2) 以 100°C 水浴加熱 30 秒終止反應。

(3) 取 0、100、200、300、400 μM ADP 各 400 μL 做為標準曲線之用。

(4) 分別將標準濃度之 ADP 與樣本加入 100 μL 反應液二(50 mM HEPES-NaOH pH 7.4、10 mM phosphocreatine、200 mM KCl、2 U creatinephosphokinase (Sigma, USA))，於 30°C 下反應 30 分鐘。

(5) 100°C 水浴加熱 30 秒終止反應。

(6) 以 6,708 $\times g$ 離心 5 分鐘。

(7) 取 400 μL 上清液加入 700 μL 反應液三(50 mM HEPES-NaOH pH 7.4、20 mM MgCl_2 10 mM Glucose、2 mM NADP、2 U glucose-6-phosphate dehydrogenase)，混合均勻後，吸取 150 μL 至 96 孔盤中。(每樣品 loading 兩個樣品槽，一個作

- 為 E1，另一個作為 E2)
- (8) 在 E2 中加入 0.5 U Hexokinase (Sigma, USA), E1 則加入同體積之 Hepes-NaOH (pH 7.4)。
 - (9) 反應 5 分鐘後，分別於 340 nm 波長下讀取 E1 及 E2 之吸光值，並計算各樣品之 $\Delta OD_{340} = E2 - E1$ 。
 - (10) 利用標準濃度 ADP 之 ΔOD_{340} 計算標準曲線，並依此標準曲線計算各樣本之 SSS 活性。

7. Granule-bound starch synthase 活性分析

參考 Nishi 等人(2001)之方法，實驗原理參考附錄二。

- (1) 取 200 μ L 澱粉粒懸浮液加入 200 μ L 反應液一(50 mM Hepes-NaOH pH 7.4、1.6 mM ADP-glucose、16.7 mM DTT)，於 30°C 下作用 30 分鐘。
- (2) 以 100°C 水浴加熱 30 秒終止反應。
- (3) 分別準備 0、12.5、25、37.5、50 μ M 之 ADP 400 μ L 作為標準曲線。
- (4) 分別將標準濃度之 ADP 與樣本加入 100 μ L 反應液二(50 mM Hepes-NaOH pH 7.4、10 mM phosphocreatine、200 mM KCl、2 U creatinephosphokinase)，於 30°C 下反應 30 分鐘。
- (5) 100°C 水浴加熱 30 秒終止反應。
- (6) 6,708 \times g 離心 5 分鐘。
- (7) 取 400 μ L 上清液加入 700 μ L 反應液三(50 mM Hepes-NaOH pH 7.4、20 mM MgCl₂ 10 mM Glucose、2 mM NADP、2 U glucose-6-phosphate dehydrogenase)，混合均勻後，吸取 150 μ L 至 96 孔盤中。(每樣品 loading 兩個樣品槽，一個作為 E1，另一個作為 E2)
- (8) 在 E2 中加入 0.5 U Hexokinase，E1 則加入同體積之 Hepes-NaOH (pH 7.4)。
- (9) 反應 5 分鐘後，分別於 340 nm 波長下讀取 E1 及 E2 之吸光值，並計算各樣品之 $\Delta OD_{340} = E2 - E1$ 。
- (10) 利用標準濃度 ADP 之 ΔOD_{340} 計算標準曲線，並依此標準曲線計算各樣本之 GBSS 活性。

8. 澱粉含量分析

參考Keppler與Decker(1974)之方法。

- (1) 將樣本以液態氮磨粉後置於 80°C 烘箱中烘乾三天。
- (2) 取少量樣本稱重記錄後，置於 2 mL 的高速離心管中。
- (3) 加入 1 mL 80% (v/v) 酒精於 80°C 水浴作用 5 分鐘，以溶出可溶性醣類。
- (4) 6,708 × g 離心 5 分鐘，回收上清液以測定樣本中之可溶性醣類(重複步驟 3 一次)。
- (5) 沈澱物以離心乾燥機乾燥 15 分鐘，去除酒精。
- (6) 同時配製濃度 5 mg/mL 與 1 mg/mL 澱粉溶液準備一起糊化，以作標準曲線之用。
- (7) 加入 1.5 mL dH₂O 將沈澱物懸浮起來，並在沸水中糊化 2 小時(不時搖晃)。
- (8) 另取 1.5 mL 高速離心管，取 50 μL 糊化後混和均勻的樣品。(同時取標準曲線濃度：0、0.2、0.4、0.6、0.8、1、2、3、4、5 mg/mL 一起進行反應)。
- (9) 加入 50 μL 0.1M citrate acid (pH 4.6)。
- (10) 加入 100 μL 反應液 (8 U/mL amyloglucosidase (Sigma, USA)、1 U/mL Pullulanase (Sigma, Israel) in 0.05 M citrate acid pH 4.6)，並於 55°C 水浴槽中作用 2 小時。
- (11) 100°C 下作用 30 秒停止反應。
- (12) 6,708 × g 離心 10 分鐘。
- (13) 在 96 孔盤中，加入離心後的樣本上清液 15 μL (每一樣本 loading 2 個樣本槽，一個為作為 E1，一個為作為 E2)。
- (14) 加入 150 μL 反應液二(0.00065 g/mL ATP、0.000934 g/mL NADP、1.65 U/mL Glucose-6-phosphate dehydrogenase in TRA buffer, TRA buffer：4.05 mM MgSO₄、0.3 M Triethanolamine hydrochloride pH 7.5)。

- (15) 於 E1 well 中加入 50 μL TRA buffer。
- (16) 於 E2 well 中加入 2 U 的 Hexokinase(2 U in 50 μL TRA buffer)。
- (17) 反應 30 分鐘後，測定 340 nm 之吸光讀值。
- (18) 將 E2 - E1 做 ΔOD_{340} ，並利用已知濃度澱粉所反應的 ΔOD_{340} 值製作成標準曲線。
- (19) 未知樣本的 ΔOD_{340} 帶入標準曲線求樣本之澱粉濃度。

9. 可溶性醣類含量分析

可溶性醣類含量分析參考McCready等人(1950)之方法。

- (1) 將澱粉含量測定步驟四中所保留的酒精作為測定樣本中可溶性醣類含量分析之用。
- (2) 將各樣本體積以 80%酒精調整至 2 mL。
- (3) 取出酒精樣本 100 μL 於 1.5 mL 離心管中，並以離心抽氣乾燥機將樣本完全乾燥。
- (4) 將乾燥的樣本以 150 μL 蒸餾水回溶，並以 6708 $\times g$ 離心 10 分鐘。
- (5) 另新鮮配製 50、100、200、300、400、600、800、1000 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之葡萄糖溶液作為標準曲線之用。
- (6) 將 100 μg 標準濃度之葡萄糖溶液與樣本分別加入玻璃試管中。
- (7) 各樣本加入 1 mL 0.2%之 Anthrone-Sulfuric acid 溶液(新鮮配置)並混合均勻。
- (8) 將樣本以沸水煮 5 分鐘。
- (9) 於 96 孔盤中加入 200 μL 之樣本並於 620 nm 波長下讀取吸光值，帶入標準曲線後求樣本濃度。

10. α -Amylase之活性分析

實驗採用Megazyme出品之 α -amylase activity assay kit (Ireland)，其實驗原理簡錄於

附錄三，並根據其操作手冊進行操作。

- (1) 葉鞘以液態氮研磨至粉末狀。
- (2) 各樣本加入其重量6倍體積(w/v)之萃取液(0.05 M sodium malate、0.05 M sodium chloride、2 mM calcium chloride、0.005 % sodium azide)。
- (3) 室溫靜置5分鐘。
- (4) 以漏斗與10 mL離心管中收集萃取液。
- (5) 以40°C水浴槽萃取20分鐘，期間每5分鐘震盪一次。
- (6) 均勻的自10 mL離心管中倒出1 mL於1.5 mL的離心管中。
- (7) 用桌上型高速離心機以 $1,000 \times g$ 、4°C下離心10分鐘。
- (8) 取100 μ L上清液於乾淨的玻璃試管中。
- (9) 同時準備空白組：先於乾淨的玻璃試管中加入1.5 mL的停止液(1% (w/v) tri-sodium phosphate solution, pH 11)，再依序加入100 μ L的反應液(5.45 mg/mL blocked p-nitrophenyl maltoheptaoside (BPNPG7)、12.5 U/mL α -glucosidase)與100 μ L所萃取的酵素上清液。
- (10) 將整架的玻璃試管與分裝的反應液一起於置於40°C水浴槽中預熱5分鐘。
- (11) 每隔10秒鐘在各個玻璃試管中加入100 μ L的反應液。
- (12) 反應20分鐘後，再依順序每隔10秒加入1.5 mL的停止液。
- (13) 混合均勻後各取200 μ L於96孔盤中。
- (14) 以96孔盤分光光度計讀取400 nm波長之吸光值。
- (15) 計算下列各值：

$$\frac{\Delta OD_{400}}{\text{incubation time}} \times \frac{\text{total volume in cell}}{\text{aliquot assayed}} \times \frac{1}{E_{mM}} \times \frac{\text{extraction volume}}{\text{sample weight}} \times \text{dilution}$$

$$\Delta OD_{400} = \text{Absorbance (sample)} - \text{Absorbance (blank)}$$

$$\text{Incubation time} = 20 \text{ min}$$

$$\text{Total volume in cell} = 1.7 \text{ mL}$$

Aliquot assayed = 0.1 mL

E_{mM} p-nitrophenol in 1% Trizma base = 18.1 (at 400 nm)

Extraction volume = 6 mL / g fresh weight

Dilution = Dilution of the original extract

Unit = U /g FW

11. β -Amylase之活性分析

實驗採用Megazyme出品之 β -amylase activity assay kit (Ireland)，其實驗原理簡錄於附錄四，並根據其操作手冊進行操作。

- (1) 各樣本以液態氮研磨至粉末狀。
- (2) 各樣本加入其重量10倍體積(w/v)之萃取液(0.05 M trizma base、1 mM EDTA、1.75 g /100 mL cysteine、pH 8.0)。
- (3) 室溫靜置5分鐘。
- (4) 以漏斗收集萃取液於10 mL離心管中。
- (5) 室溫下搖晃1小時。
- (6) 自10 mL離心管均勻的倒出1 mL萃取液於1.5 mL的高速離心管中。
- (7) 以桌上型高速離心機以 $1,000 \times g$ ， $4^{\circ}C$ 下離心10分鐘。
- (8) 取50 μ L上清液於新的1.5 mL高速離心管中，並加入150 μ L之稀釋液(100 mM maleic acid、1 mM di-Sodium EDTA、0.02% sodium azide、1 mg/mL BSA、pH 6.2)。
- (9) 在乾淨的玻璃試管中加入100 μ L上述之酵素萃取液。
- (10) 同時準備空白組：先於乾淨的玻璃試管中加入1.5 mL的停止液(1% (w/v) trizma base)再依序加入100 μ L的反應液(4.75 mg/mL p-nitrophenyl maltopentaoside (PNPG5)、100 U/mL α -glucosidase)與100 μ L的酵素萃取液(釋比例同步驟8)。
- (11) 將整架的玻璃試管與預備的反應液於 $40^{\circ}C$ 水浴槽中預熱5分鐘。

- (12) 每隔10秒鐘再各個玻璃試管中依序加入100 μ L的反應液。
- (13) 反應10分鐘後，再依順序每隔10秒加入1.5 mL的停止液。
- (14) 混合均勻後各取200 μ L於96孔盤中。
- (15) 以96孔盤分光光度計讀取410 nm波長之吸光值。
- (16) 計算下列各值：

$$\frac{\Delta OD_{410}}{\text{incubation time}} \times \frac{\text{total volume in cell}}{\text{aliquot assayed}} \times \frac{1}{E_{mM}} \times \frac{\text{extraction volume}}{\text{sample weight}} \times \text{dilution}$$

ΔOD_{410} = Absorbance (sample) – Absorbance (blank)

Incubation time = 10 min

Total volume in cell = 1.7 mL

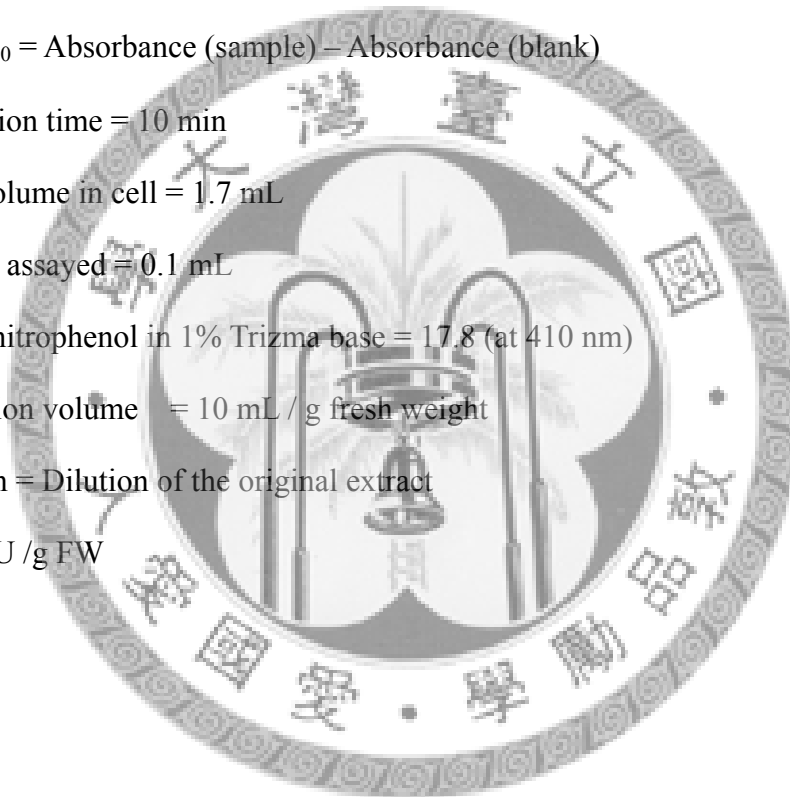
Aliquot assayed = 0.1 mL

E_{mM} p-nitrophenol in 1% Trizma base = 17.8 (at 410 nm)

Extraction volume = 10 mL / g fresh weight

Dilution = Dilution of the original extract

Unit = U / g FW



結果

1. 抽穗前葉鞘中非結構性碳水化合物之代謝

1.1. 溫度影響葉鞘中澱粉之累積

為了瞭解溫度對於葉鞘分別處於sink與source時期澱粉代謝的影響，我們將水稻抽穗期區分為抽穗前的sink時期與抽穗後的source時期，分別進行溫度處理的實驗。首先，針對抽穗前葉鞘處於sink時期之時，各溫度處理對葉鞘中非結構性碳水化合物累積的影響。我們於水稻抽穗前6天將水稻移入日/夜溫為15/13°C、25/20°C、35/30°C三種溫室中。並自實驗處理當天開始，每隔三天各取樣一次，直到25/20°C處理組抽穗。因受溫度改變之影響，各組處理抽穗日期有所不同，35/30°C組較25/20°C組提早一天抽穗，而15/13°C組則是與25/20°C組同天抽穗但於抽穗後並無開花跡象。分析水稻-2葉鞘中澱粉含量，由圖一顯示在進行溫度處理後的前三天，各處理對葉鞘中的澱粉含量並無造成顯著性的差異。但到了溫度處理後第6天，對照組(25/20°C)之澱粉含量大增，此時低溫處理(15/13°C)與對照組(25/20°C)相比澱粉含量差異不大，但高溫處理(35/30°C)下的澱粉含量卻明顯下降至對照組(25/20°C)的37.14%，顯示葉鞘中澱粉的累積確實受到高溫環境(35/30°C)的影響而降低。

1.2. 溫度影響葉鞘中可溶性醣類之含量

由圖一的結果顯示，高溫處理下(35/30°C)葉鞘中澱粉的含量明顯降低。為瞭解在葉鞘在澱粉生合成過程中是否受限於基質的供應，而使得澱粉的累積受到影響，我們進一步的分析葉鞘中可溶性醣類含量的變化。由圖二顯示，可溶性醣類在15/13°C處理三天內快速累積，達到溫度處理開始時的1.54倍，之後則一直維持著相當高濃度的可溶性醣含量。而在對照組(25/20°C)與高溫處理(35/30°C)兩組之趨勢分析顯示，處理三天之後可溶性醣含量略為增加，但到了第6天時兩處理之葉鞘中可溶性醣類含量皆下降為第3天時的61~62%。在溫度處理的過程中，高溫處理組

(35/30°C)與對照組(25/20°C)所表現出的醣類含量與變化趨勢皆相去不遠，但在高溫處理(35/30°C)下，澱粉含量卻不如對照組(25/20°C)般大量累積。

1.3. 溫度處理下之蛋白質含量與各澱粉生合成酵素之活性

除了供應作為澱粉生合成的受質含量受溫度影響變化以外，澱粉累積量亦可能受到其生合成相關酵素活性之影響。為測試此一假設，我們亦測定GBSS與SSS在各溫度處理下的活性變化，觀察是否因此造成澱粉累積量之不同。

水稻-2葉片葉鞘之GBSS活性在高溫處理下(35/30°C)與對照組(25/20°C)表現幾無差別，但在低溫處理下(15/13°C)其活性在第0天至第3天期間略為降低至約為對照組(25/20°C)處理的80%(圖三-A)。到了第6天之後，因為隨著高溫處理與對照組所表現的活性亦開始下降，於是三個處理間GBSS的活性又無差異存在了。而SSS活性在對照組(25/20°C)下於溫度處理期間顯示活性略為提高的趨勢，而15/13°C處理下的SSS活性，則在實驗過程中無任何變化，一直維持固定的活性。高溫處理下的SSS活性則在第0天至第3天時下降，之後則維持與對照組相同但活性略低的趨勢(圖三-B)。

而溫度處理對於葉鞘中蛋白質含量的影響，由圖四顯示，在開始試驗的前三天，對照組的蛋白質含量仍在上升。而在低溫處理下，葉鞘中可溶性蛋白質則含量幾乎沒有變化。而在高溫處理下，則顯示葉鞘中蛋白質含量的顯著下降。

2. 抽穗後溫度對穀粒充實與葉鞘中澱粉代謝之影響

2.1. 各種溫度處理下水稻穀粒充實之差異

為瞭解溫度處理對穀粒充實的影響，在水稻抽穗後即分別將水稻移往35/30°C、25/20°C、15/13°C三種不同溫度之溫室。並於抽穗後第0、3、6、9、12天時，將稻穗取下以80°C烘箱烘乾、脫粒後秤取穀粒重，並將其結果與充實速率整理如圖五。在高溫下35/30°C下穀粒充實速率明顯提高，當抽穗後第9至12天時，充實速

度達到25/20°C處理下的2.87倍(圖五-B)，顯示高溫下確實提高了穀粒充實速度。

2.2. 各溫度處理下抽穗後葉鞘澱粉降解過程的改變

為了瞭解抽穗後葉鞘中暫存性澱粉轉移到穀粒充實的過程是否受到溫度的影響，我們對抽穗後的水稻進行不同溫度的處理並分析其葉鞘中澱粉含量。但若於抽穗後立即將水稻分組進行溫度處理，將會使抽穗開花受到阻礙，使得水稻sink size的不同並影響實驗目標。到了抽穗後第9天(約為開始開花後一週)，大多數的穎花皆已開花授粉，並進入穀粒充實期，因此我們將開始處理的時間點設於此時。如此我們可以將實驗變因控制在溫度對葉鞘供應穀粒充實能力的影響上。

因此於抽穗後第9天開始，將水稻分別移至高溫(35/30°C)、低溫(15/13°C)與對照組(25/20°C)之溫室下處理，並於處理後第1、3、6天收取水稻-2葉葉鞘進行澱粉含量分析(圖六)。結果顯示，在進行溫度處理後第1至第3天間，25/20°C處理下葉鞘中澱粉以平均42.6 mg/day的速度驟降，之後則澱粉含量幾乎不再進一步變化。而高溫處理下，則顯示澱粉以穩定且緩慢的速度(9 mg/day)緩緩減少。而在溫度處理期間，低溫處理下的葉鞘中澱粉含量則幾乎沒有任何降解的現象，一直維持在相當高的澱粉含量。

2.3. 溫度處理下葉鞘中澱粉水解酵素活性之變化

為了探討各溫度處理間，葉鞘中澱粉含量下降速率不同之原因，我們進一步分析澱粉水解過程中一般被認為最主要的兩種澱粉水解酵素之活性，分別為 α -amylase與 β -amylase。在對照組(25/20°C)的處理下， α -amylase的活性在處理後第1天所表現的活性最高，之後隨著時間慢慢降低，而高溫處理組(35/30°C)則亦顯示類似的活性變化趨勢(圖七-A)。相較於其他兩組 α -amylase活性下降的趨勢， α -amylase在低溫處理下(15/13°C)則維持較高的活性直到處理後第三天才開始下降(圖七-A)。而分析 β -amylase在各溫度處理下的活性，則顯示在溫度處理期間各處

理皆並無明顯的變化趨勢存在，且各溫度處理間的差異亦不顯著(圖七-B)。



討論

1. 水稻抽穗期的劃分與實驗設計

水稻葉鞘中的澱粉於抽穗期前後發生sink-source transition現象時，並沒有明確的時間點指出-2葉葉鞘於何時開始累積澱粉，又將於何時開始降解澱粉。但當以人為方式於抽穗前去除稻穗，使之沒有「抽穗」這個明確時間點的劃分時，與正常抽穗的對照組比較，去穗組的-2葉葉鞘會持續累積澱粉一段時間才開始降解，且其降解之幅度也遠不如對照組正常抽穗的植株，顯示抽穗對於葉鞘中暫存性澱粉的累積與降解，為具有指標性的分界(Chen and Wang, 2008)。因此為了瞭解溫度處理對於葉鞘處於sink stage與source stage時的影響，我們利用抽穗當作這兩個時期的劃分，並分別針對各時期進行不同的溫度處理，以觀察其對葉鞘中澱粉代謝的影響。

Marcelis認為，植物體內sink strength對同化物質分佈的影響非常大(Marcelis, 1996)。因此我們在設計溫度影響葉鞘作為source組織提供碳源的實驗時，特別注意溫度對sink strength的影響。為了避免溫度處理對穀粒造成不稔，進而影響葉鞘的source strength，我們將抽穗後溫度處理設定於抽穗後第9天進行，此時大多數的穎花已完成受粉，以減少sink size不同對實驗結果的影響。

2. 各溫度處理下葉鞘中非結構性碳水化合物累積之差異

根據我們的實驗結果顯示(圖一)，25/20°C下水稻-2葉鞘自抽穗前3天與抽穗當天相比，澱粉累積量明顯多了1.85倍，同時葉鞘中可溶性醣類含量略為下降，顯示在一般環境下，大多數的碳水化合物主要以澱粉的形式貯藏於水稻葉鞘中。但在高溫環境下，可溶性醣類含量變化雖然與對照組相似(圖二)，但澱粉含量部份卻不增反降(圖一)。1987年Weng等人發表植物呼吸作用因溫度上升而提高的速率大於光合作用速率提高的幅度(Weng and Chen, 1987)，因此推論高溫下葉鞘中澱粉累積量無法上升，可能是因同化物質大多因呼吸作用的提高而流失，進而影響葉鞘中

澱粉的累積。

而相對於對照組與高溫處理，在低溫下我們觀察到大量的非結構性碳水化合物以可溶性醣類的形式存在。除了我們的實驗結果之外，亦有其他研究報告描述植物於低溫環境下進行可溶性醣類的累積(Guy et al., 1992; Kaplan and Guy, 2004)。一般認為，在細胞中存在高濃度的可溶性醣類在低溫環境下可以維持細胞內外的滲透壓與光合作用的電子傳遞鏈(Kaplan and Guy, 2004)，保護植物度過低溫逆境。

3. 溫度對於葉鞘澱粉生合成酶之酵素活性的影響

圖三中GBSS與SSS的活性分析顯示，此二種澱粉生合成酶之活性在各溫度處理間的差意並無達到顯著水準。因此推澱粉生合成酶之酵素活性並非造成高溫環境下，葉鞘中澱粉累積量減少之主因。然而，以SSS酵素活性而言，溫度處理透過影響葉鞘中可溶性蛋白的含量亦是另一個影響其總活性變化的主要因子。

高溫影響植物蛋白含量的報導甚多，如2001年Chaitanya等人分析桑葚在高溫環境下葉片的代謝，指出葉片中蛋白質含量與碳水化合物含量皆因高溫而下降(Chaitanya et al., 2001)。He等人於2005年報告，禾本科的雜草*Agrostis stolonifera*於高溫處理下細胞內蛋白酶的活性提高，並加速蛋白質的分解(He et al., 2005)。蛋白質的降解除除了使得各澱粉代謝酵素活性降低外，在葉片中佔絕大部分的葉綠素含量亦隨高溫的處理而明顯下降(Blum et al., 1994)，進而降低光合作用的能力，使葉片進入老化時期，同時也影響了葉片中碳水化合物的累積。

由實驗結果顯示，低溫處理下蛋白質的含量在處理期間幾乎無任何變化(圖四)。根據Maruyama等人對生長於低溫(15°C)下水稻幼苗的第四葉片進行分析，低溫下蛋白質含量的累積量遠低於對照組，其中RuBP carboxylase與數種負責在葉綠體中進行光合作用電子傳遞與光磷酸化(photophosphorylation)的蛋白質生合成被明顯抑制(Maruyama et al., 1990)。雖然本實驗之研究對象為水稻-2葉片之葉鞘，但

在層層的葉鞘包圍下，仍有約一半暴露於外界可供進行光合作用的反應。因此推測在對照組下，所萃取之可溶性蛋白中仍有很大一部份的光合作用相關蛋白，在處理開始之後繼續生合成。而這一部份的光合作用蛋白，其生合成卻在低溫環境下受到抑制，使得可溶性蛋白含量無法如對照組般增加。

4. 抽穗後葉鞘中澱粉的降解過程受溫度之影響

在實驗未開始時我們假設，高溫提高穀粒充實前期的速度(Morita et al., 2005)，而葉鞘作為提供穀粒充實來源之一，亦應提高其供應的能力來支持穀粒的充實。然而在我們的實驗結果卻顯示，在對照組(25/20°C)處理開始後第1~3天間所出現的澱粉快速降解的現象，在高溫處理(35/30°C)下並不復見，相反地其降解速度甚至可以平緩來形容整個澱粉含量減少的過程(圖六)。此外，分析水稻葉鞘中兩種主要的水解酵素 α -amylase與 β -amylase。發現與對照組相比，高溫下之活性並沒有比較高(圖七)，因此推測，水解酵素再之活性並不因溫度提高而提高其活性，因此葉鞘中澱粉降解速度較為緩慢。

5. 結論與未來展望

葉片中的澱粉並非如貯存器官中的累積性澱粉般處於一個長時間穩定的累積或分解的過程，而是處在一個對環境敏感且同時進行累積與分解的動態平衡中(Smith et al., 2003)。即使澱粉合成速率不斷地提高，但若同時澱粉分解速率亦增加的更快，則其結果仍是顯示澱粉含量的下降，反之亦然。

本論文嘗試利用抽穗前與抽穗後兩個時期，分別釐清各種溫度對於葉鞘貯存與供源兩種角色的影響。但溫度環境不利於產量的原因非常的複雜，從授粉率影響的sink size開始到葉片的老化、呼吸作用、碳水化合物代謝與蛋白質含量、酵素在各溫度環境下的實際活性等因素都是影響葉鞘中澱粉提供至穀粒的主要原因。又本論文在澱粉生合成酵素活性分析的部份僅提供了SSS、GBSS兩酵素活性的分

析結果，作為複雜的澱粉生合成過程來說畢竟未能全部涵蓋並由此斷定溫度對澱粉生合成過程影響僅及於此。或是以萃取蛋白再加以分析活性的方式，是否真能區分各酵素活性在該溫度處理下所受之影響等等。此外，在葉鞘澱粉生合成過程中，未必僅只有澱粉合成相關酵素的作用，應亦同時存在澱粉分解酵素的分解。未能同時分析分解與合成酵素的活性與各溫度下各酵素的活性，是本實驗設計時所欠慮之處。因此我們仍在進行實驗，希望能將此一部份資料取得，使得本課題能更加完備。



參考文獻

- Baunsgaard L, Lütken H, Mikkelsen R, Glaring MA, Pham TT, Blennow A (2005)**
A novel isoform of glucan, water dikinase phosphorylates pre-phosphorylated α -glucans and is involved in starch degradation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **41**: 595-605
- Blum A, Sinmena B, Mayer J, Golan G, Shpiler L (1994)** Stem reserve mobilisation supports wheat-grain filling under heat stress. *Functional Plant Biology* **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. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254
- Chaitanya KV, Sundar D, Reddy AR (2001)** Mulberry leaf metabolism under high temperature stress. *Biologia Plantarum* **44**: 379-384
- Chen HJ, Wang SJ (2008)** Molecular regulation of sink-source transition in rice leaf sheaths during the heading period. *Acta Physiologiae Plantarum* **30**: 639-649
- Cock JH, Yoshida S (1972)** Accumulation of ^{14}C -labelled carbohydrate before flowering and its subsequent redistribution and respiration in the rice plant. *Japanese Journal of Crop Science* **41**: 226-234
- Critchley JH, Zeeman SC, Takaha T, Smith AM, Smith SM (2001)** A critical role for disproportionating enzyme in starch breakdown is revealed by a knock-out mutation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **26**: 89-100
- Ghosh HP, Preiss J (1966)** Adenosine Diphosphate Glucose Pyrophosphorylase. A regulatory enzyme in the biosynthesis of starch in spinach leaf chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry* **241**: 4491-4504
- Guan HP, Preiss J (1993)** Differentiation of the properties of the branching isozymes

- from maize (*Zea mays*). *Plant Physiology* **102**: 1269-1273
- Guy CL, Huber JLA, Huber SC** (1992) Sucrose phosphate synthase and sucrose accumulation at low temperature. *Plant and Cell Physiology* **100**: 502-508
- Hawker J, Jenner C** (1993) High temperature affects the activity of enzymes in the committed pathway of starch synthesis in developing wheat endosperm. *Functional Plant Biology* **20**: 197-209
- He Y, Liu X, Huang B** (2005) Changes in protein content, protease activity, and amino acid content associated with heat injury in creeping bentgrass. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **130**: 842-847
- 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 Production Science* **2**: 178-183
- Ishikawa T, Akita S, Li Q** (1993) Relationship between content of nonstructural carbohydrates before panicle initiation stage and grain yield in rice (*Oryza sativa* L.). *Japanese Journal of Crop Science* **62**: 130-131
- Kötting O, Pusch K, Tiessen A, Geigenberger P, Steup M, Ritte G** (2005) Identification of a novel enzyme required for starch metabolism in arabidopsis leaves. The phosphoglucan, water dikinase. *Plant Physiology* **137**: 242-252
- Kaplan F, Guy CL** (2004) β -Amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock. *Plant Physiology* **135**: 1674-1684
- Keeling P, Banisadr R, Barone L, Wasserman B, Singletary G** (1994) Effect of temperature on enzymes in the pathway of starch biosynthesis in developing wheat and maize grain. *Functional Plant Biology* **21**: 807-827
- Keeling PL, Bacon PJ, Holt DC** (1993) Elevated temperature reduces starch

deposition in wheat endosperm by reducing the activity of soluble starch synthase.

Planta **191**: 342-348

Keppler D, Decker K (1974) Glycogen: Determination with amyloglucosidase. In H. U. Bergmeyer, ed, *Methods of enzymatic analysis*, Vol 3. Academic Press, New York, pp 1127-1131

Lao NT, Schoneveld Onard, Mould RM, Hibberd JM, Gray JC, Kavanagh TA (1999) An *Arabidopsis* gene encoding a chloroplast-targeted β -amylase. *The Plant Journal* **20**: 519-527

Lloyd JR, Kossmann J, Ritte G (2005) Leaf starch degradation comes out of the shadows. *Trends in Plant Science* **10**: 130-137

Lobell DB, Field CB (2007) Global scale climate-crop yield relationships and the impacts of recent warming *Environmental Research Letters* **2**: 014002

Marcelis L (1996) Sink strength as a determinant of dry matter partitioning in the whole plant. *Journal of Experimental Botany* **47**: 1281-1291

Maruyama S, Yatomi M, Nakamura Y (1990) Response of rice leaves to low temperature I. Changes in basic biochemical parameters. *Plant and Cell Physiology* **31**: 303-309

McCready RM, Guggolz J, Silveira V, Owens HS (1950) Determination of starch and amylose in vegetables. *Analytical Chemistry* **22**: 1156-1158

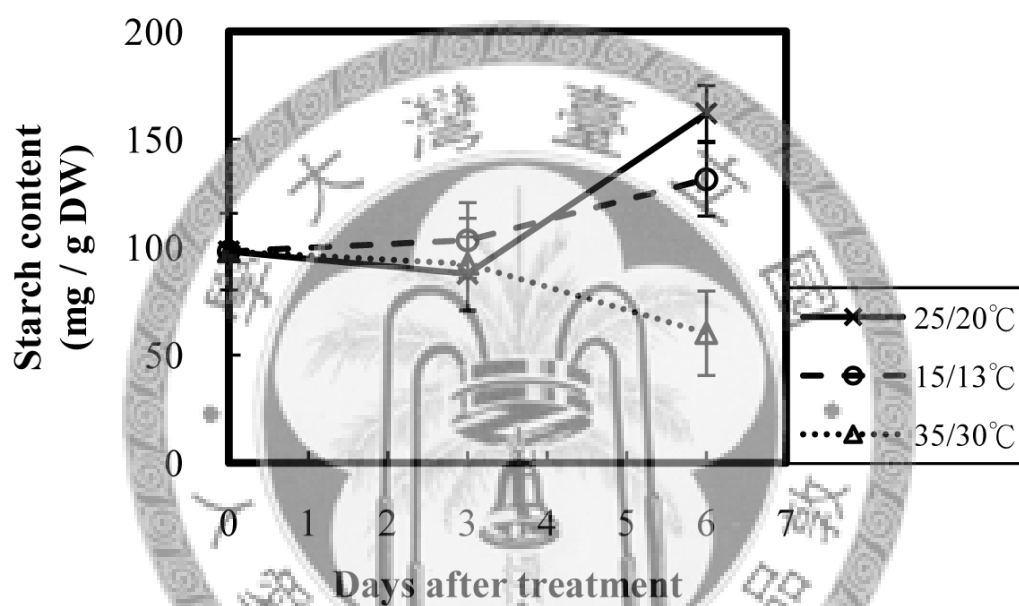
Mikkelsen R, Baunsgaard L, Blennow A (2004) Functional characterization of α -glucan, water dikinase, the starch phosphorylating enzyme. *Biochemical Journal* **377**: 525-532

Morita S, Yonemaru JI, Takanashi JI (2005) Grain growth and endosperm cell size under high night temperatures in rice (*Oryza sativa* L.). *Annals of Botany* **95**: 695-701

- Nagai T, Makino A** (2009) Differences between rice and wheat in temperature responses of photosynthesis and plant growth. *Plant and Cell Physiology* **50**: 744-755
- Nakamura Y, Yuki K, Park SY, Ohya T** (1989) Carbohydrate metabolism in the developing endosperm of rice grains. *Plant and Cell Physiology* **30**: 833-839
- 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
- Nishi A, Nakamura Y, Tanaka N, Satoh H** (2001) Biochemical and genetic analysis of the effects of amylose-extender mutation in rice endosperm. *Plant Physiology* **127**: 459-472
- Peng S, Huang J, Sheehy JE, Laza RC, Visperas RM, Zhong X, Centeno GS, Khush GS, Cassman KG** (2004) Rice yields decline with higher night temperature from global warming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 9971-9975
- Perez CM, Palmiano EP, Baun LC, Juliano BO** (1971) Starch metabolism in the leaf sheaths and culm of rice. *Plant Physiology* **47**: 404-408
- Ritte G, Lloyd JR, Eckermann N, Rottmann A, Kossmann J, Steup M** (2002) The starch-related R1 protein is an α -glucan, water dikinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 7166-7171
- Sikka VK, Choi SB, Kavakli IH, Sakulsingharoj C, Gupta S, Ito H, Okita TW** (2001) Subcellular compartmentation and allosteric regulation of the rice endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Science* **161**: 461-468
- Smith AM, Zeeman SC, Thorneycroft D, Smith SM** (2003) Starch mobilization in leaves. *Journal of Experimental Botany* **54**: 577-583
- Tashiro T, Wardlaw I** (1991) The effect of high temperature on the accumulation of

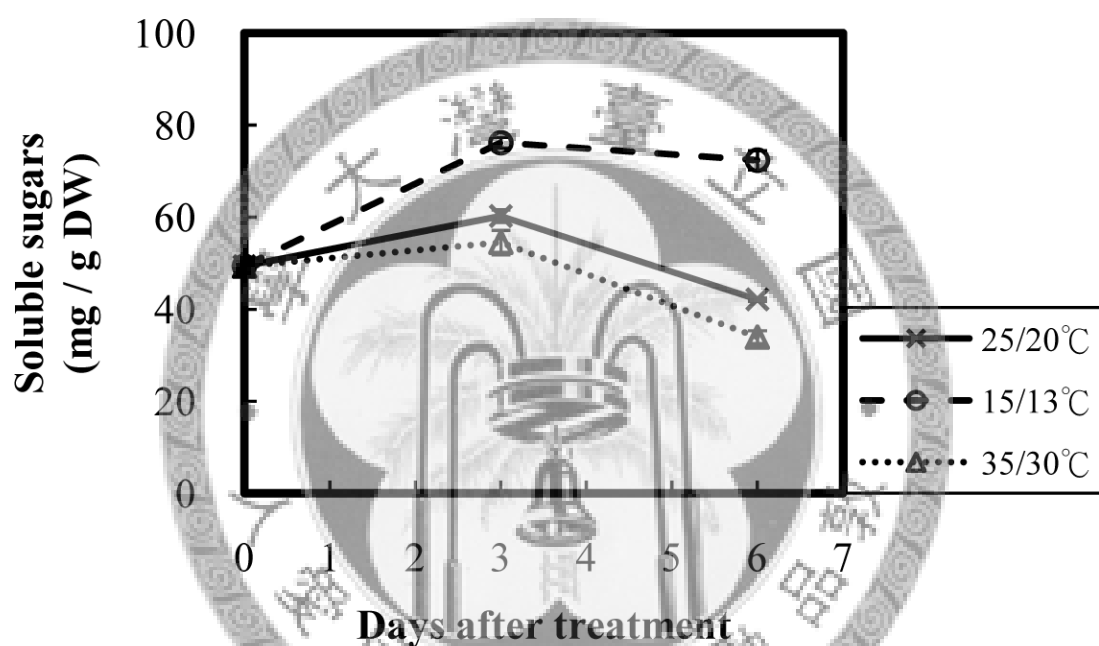
- dry matter, carbon and nitrogen in the kernel of rice. *Functional Plant Biology* **18**: 259-265
- Virgona J, Barlow E** (1991) Drought stress induces changes in the non-structural carbohydrate composition of wheat stems. *Functional Plant Biology* **18**: 239-247
- Watanabe Y, Nakamura Y, Ishii R** (1997) Relationship between starch accumulation and activities of the related enzymes in the leaf sheath as a temporary sink organ in rice (*Oryza sativa*). *Functional Plant Biology* **24**: 563-569
- Weise S, Weber AM, Sharkey T** (2004) Maltose is the major form of carbon exported from the chloroplast at night. *Planta* **218**: 474-482
- Weng J, Chen C** (1987) Differences between Indica and Japonica rice varieties in CO₂ exchange rates in response to leaf nitrogen and temperature. *Photosynthesis Research* **14**: 171-178
- Yang J, Zhang J** (2006) Grain filling of cereals under soil drying. *New Phytologist* **169**: 223-236
- Yang J, Zhang J, Huang Z, Zhu Q, Wang L** (2000) Remobilization of carbon reserves is improved by controlled soil-drying during grain filling of wheat. *Crop Science* **40**: 1645-1655
- Yang J, Zhang J, Wang Z, Zhu Q** (2001) Activities of starch hydrolytic enzymes and sucrose-phosphate synthase in the stems of rice subjected to water stress during grain filling. *Journal of Experimental Botany* **52**: 2169-2179
- Yang J, Zhang J, Wang Z, Zhu Q, Liu L** (2004) Activities of fructan- and sucrose-metabolizing enzymes in wheat stems subjected to water stress during grain filling. *Planta* **220**: 331-343
- Zhao H, Dai T, Jiang D, Cao W** (2008) Effects of high temperature on key enzymes involved in starch and protein formation in grains of two wheat cultivars. *Journal of*





圖一、溫度對於抽穗前-2葉葉鞘澱粉含量變化之影響

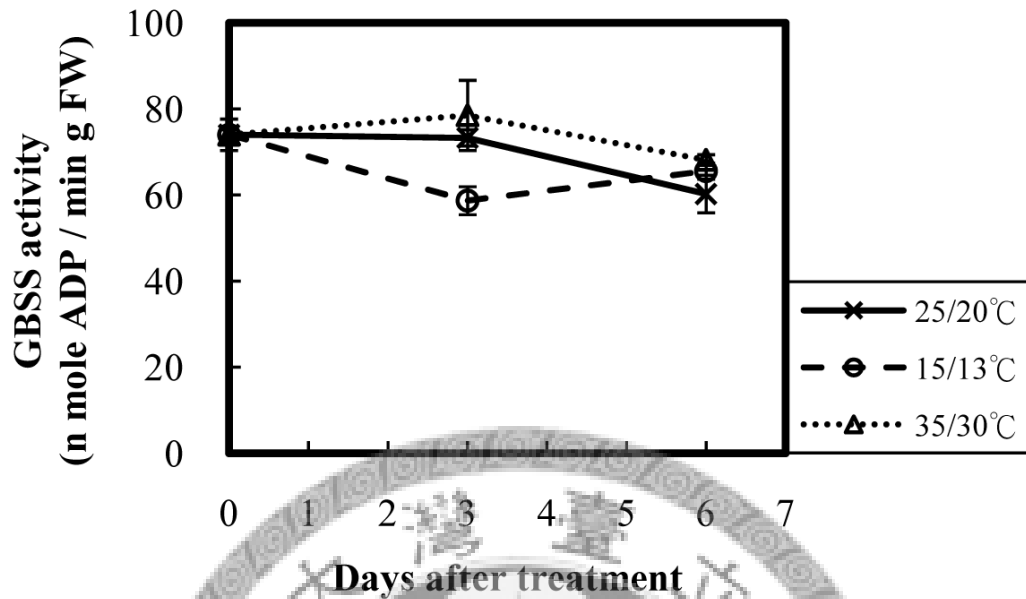
於抽穗前6天分別將水稻移至高溫(35/30°C)、低溫(15/13°C)與對照組(25/20°C)進行溫度處理，並分別分析處理後0、3、6天之-2葉葉鞘之澱粉含量變化。—x—：25/20°C、-●-：15/13°C、...▲...：35/30°C，垂直線段代表n = 4之Standard Error (S.E.)，DW 代表dry weight。



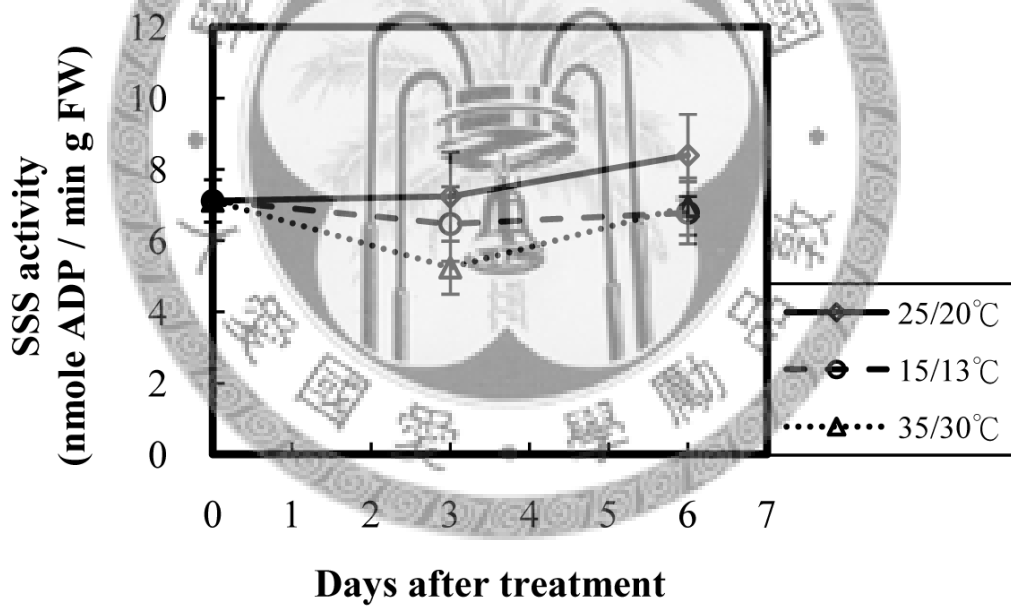
圖二、溫度對於抽穗前-2葉葉鞘中可溶性醣類含量之影響

於抽穗前6天分別將水稻移至高溫(35/30°C)、低溫(15/13°C)與對照組(25/20°C)進行溫度處理，並分別分析處理後0、3、6天之-2葉葉鞘之可溶性醣類含量變化。—×—：25/20°C、—●—：15/13°C、……△……：35/30°C，垂直線段為S.E.(n = 5)，DW代表 dry weight。

A.

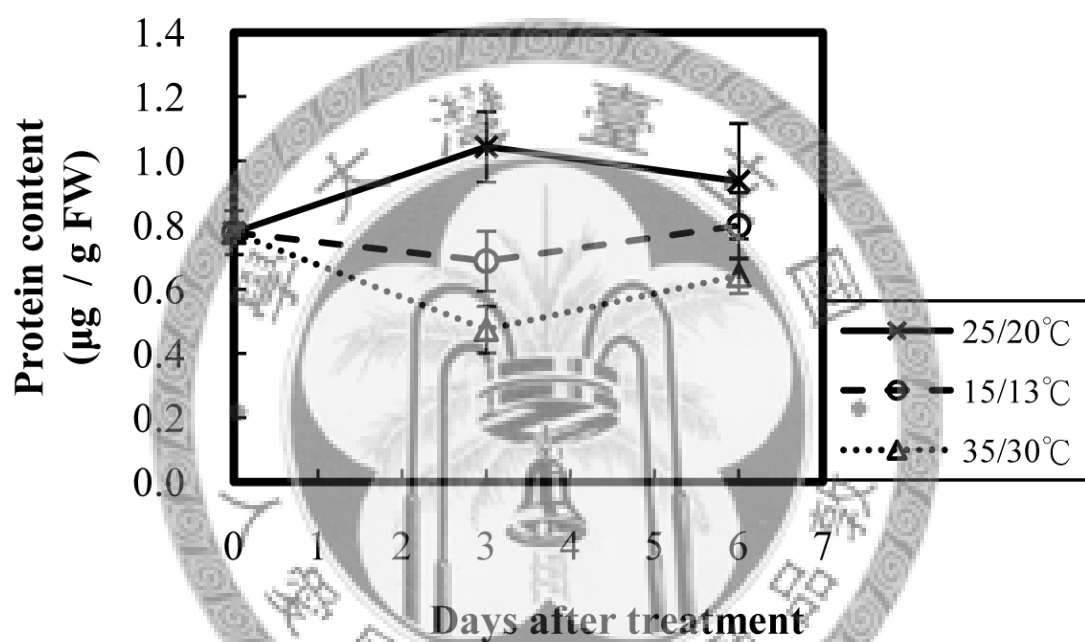


B.



圖三、溫度對於抽穗前-2葉葉鞘中澱粉合成酶酵素活性之影響

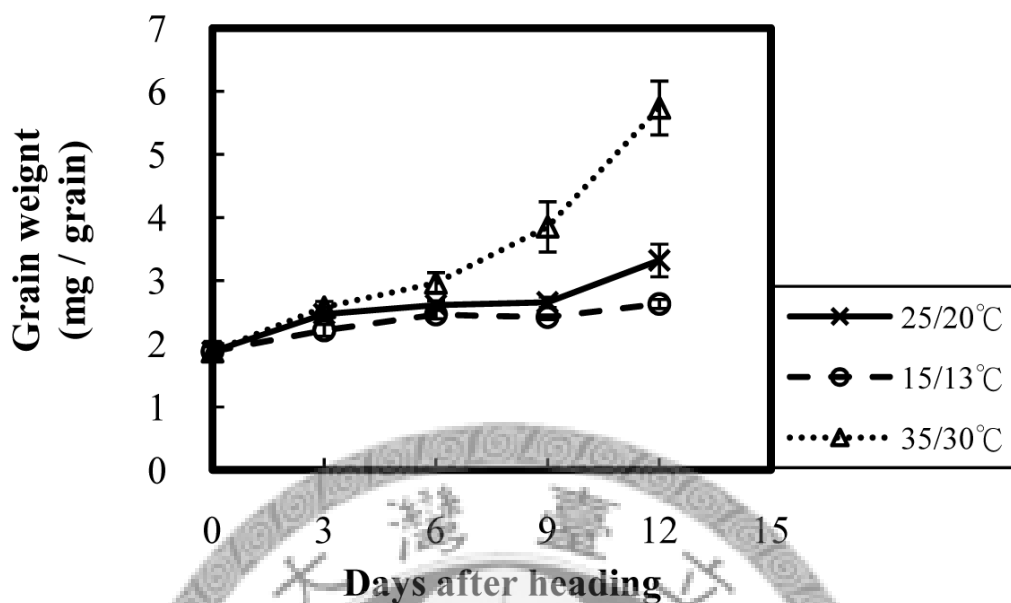
於抽穗前6天分別將水稻移至高溫(35/30°C)、低溫(15/13°C)與對照組(25/20°C)進行溫度處理，並分別分析處理後0、3、6天之-2葉葉鞘中澱粉合成酶之酵素活性變化。(A)GBSS activity。垂直線段為S.E. (n = 4)。(B)SSS activity。垂直線段為S.E. (n = 5)。—x— : 25/20°C、-o- : 15/13°C、...△... : 35/30°C，FW代表fresh weight。



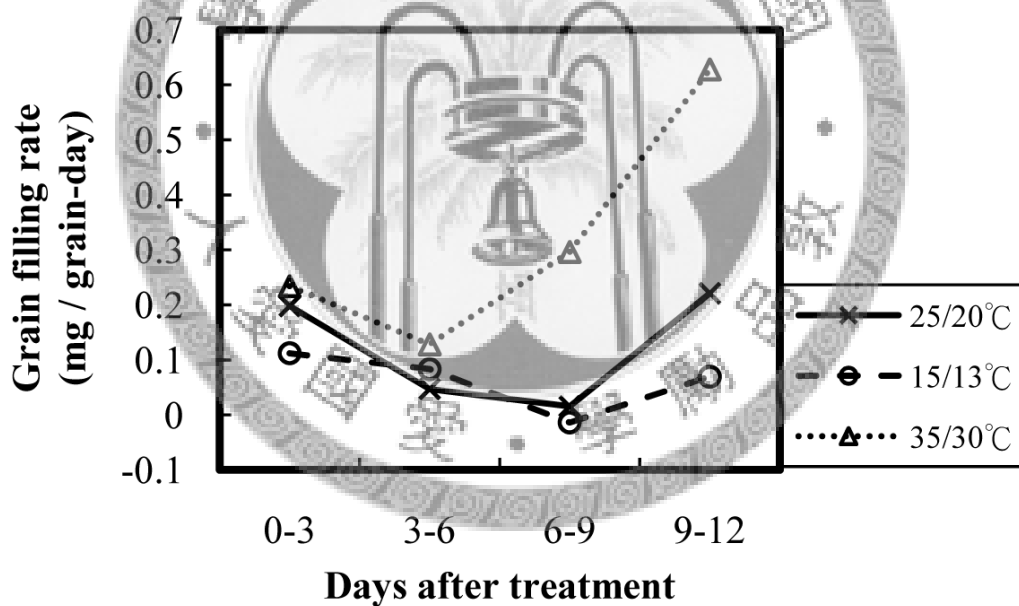
圖四、溫度對於抽穗前-2葉葉鞘中蛋白質含量變化之影響

於抽穗前6天分別將水稻移至高溫(35/30°C)、低溫(15/13°C)與對照組(25/20°C)進行溫度處理，並分別分析處理後0、3、6天之-2葉葉鞘之蛋白質含量變化。—×—：25/20°C、—●—：15/13°C、……▲……：35/30°C，垂直線段代表n = 5之S.E.。FW代表 fresh weight。

A.

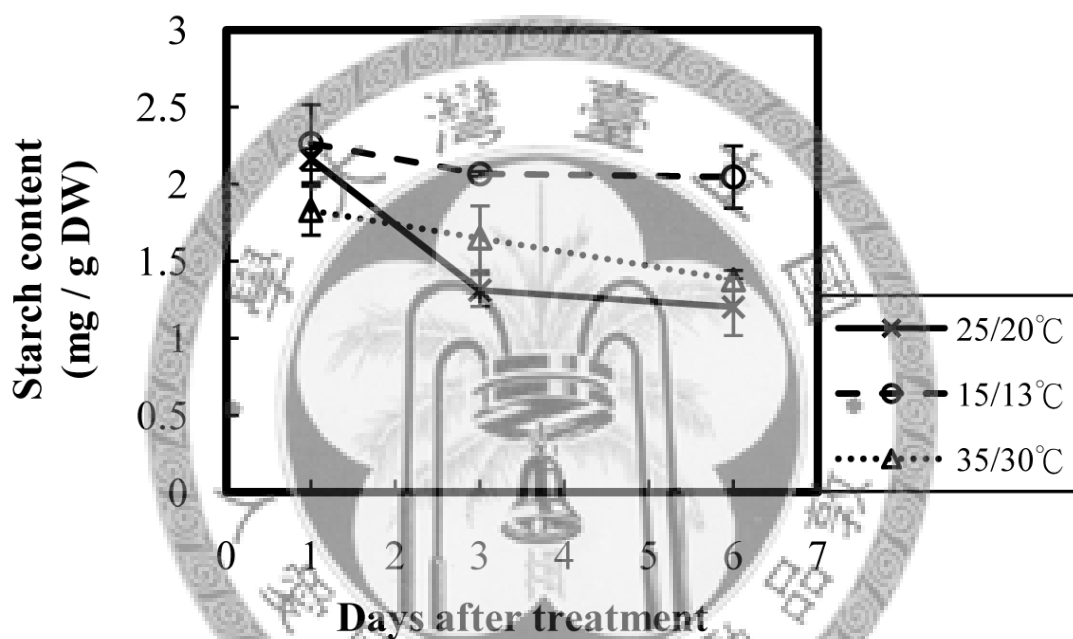


B.



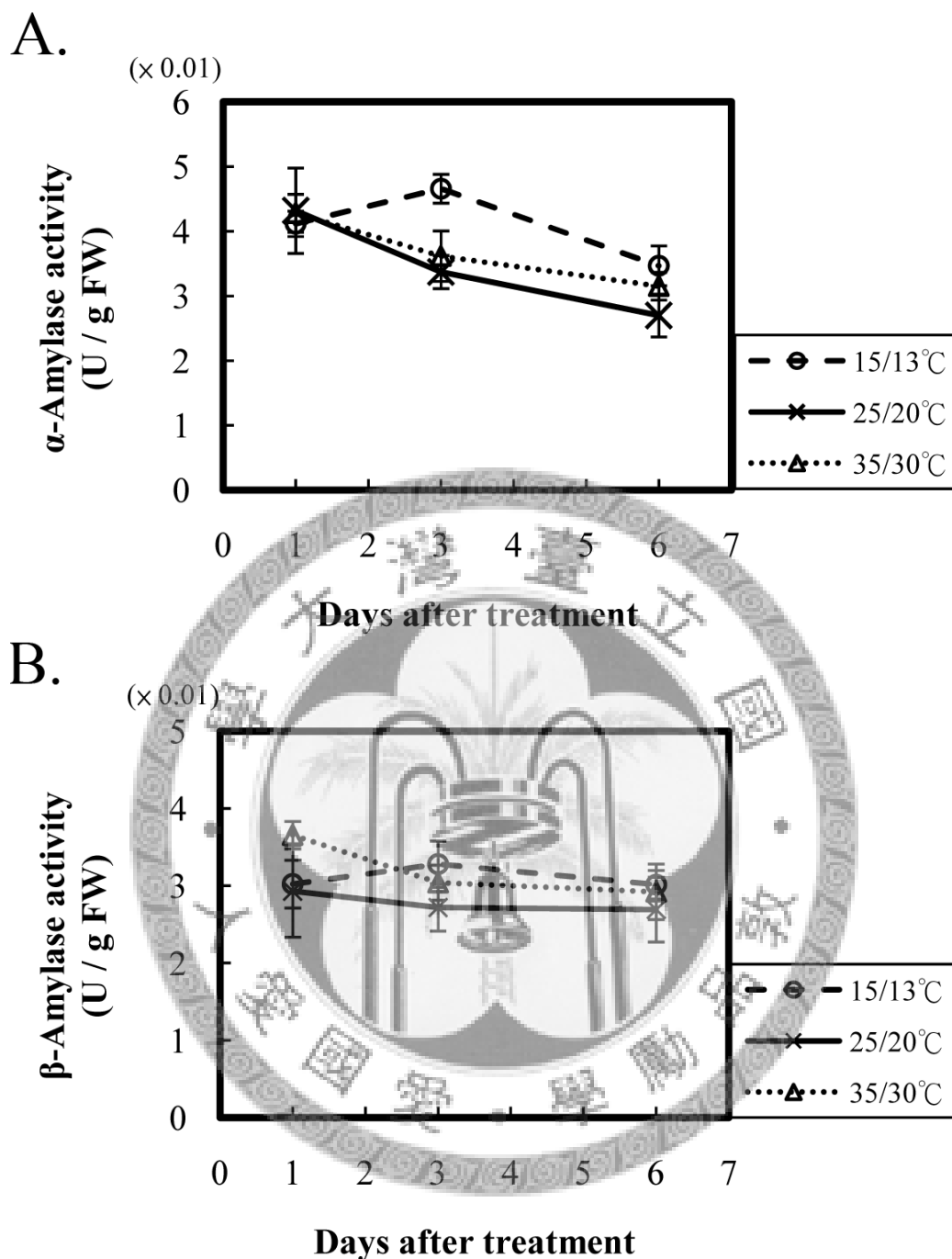
圖五、溫度對於抽穗後穀粒充實與充實速率之影響

於抽穗當天分別將水稻移至高溫(35/30°C)、低溫(15/13°C)與對照組(25/20°C)進行溫度處理，並分別分析處理後0、3、6、9、12天之穀粒重量充實速率。(A)穀粒重量變化。(B)穀粒充實速率。—×—：25/20°C、—●—：15/13°C、……△……：35/30°C，垂直線段代表n=5之S.E.。



圖六、溫度對抽穗後-2葉葉鞘中澱粉含量變化之影響

於抽穗後第9天分別將水稻移至高溫(35/30°C)、低溫(15/13°C)與對照組(25/20°C)進行溫度處理，並分別分析處理後1、3、6天之-2葉葉鞘中澱粉含量變化。—×—：25/20°C、—●—：15/13°C、……▲……：35/30°C，垂直線段代表n=3之S.E.，DW代表dry weight。



圖七、溫度對於抽穗後-2葉葉鞘澱粉水解酵素活性之影響

於抽穗後第9天分別將水稻移至高溫(35/30°C)、低溫(15/13°C)與對照組(25/20°C)進行溫度處理，並分別分析處理後1、3、6天之-2葉葉鞘中澱粉水解酵素活性。(A) α -amylase之活性變化。垂直線段為S.E. (n = 4)。(B) β -amylase之活性變化。垂直線段為S.E. (n = 4)。—×— : 25/20°C、-●- : 15/13°C、.....△..... : 35/30°C，FW代表 fresh weight。

附錄一

● 木村氏水耕液

A液：

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	24.1 g/L
KNO_3	9.25 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	67.5 g/L
KH_2PO_4	12.4 g/L

B液：

Fe-citrate	7.5 g/L
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	43.1 g/L
12N HCl	41.67 mL

C液：

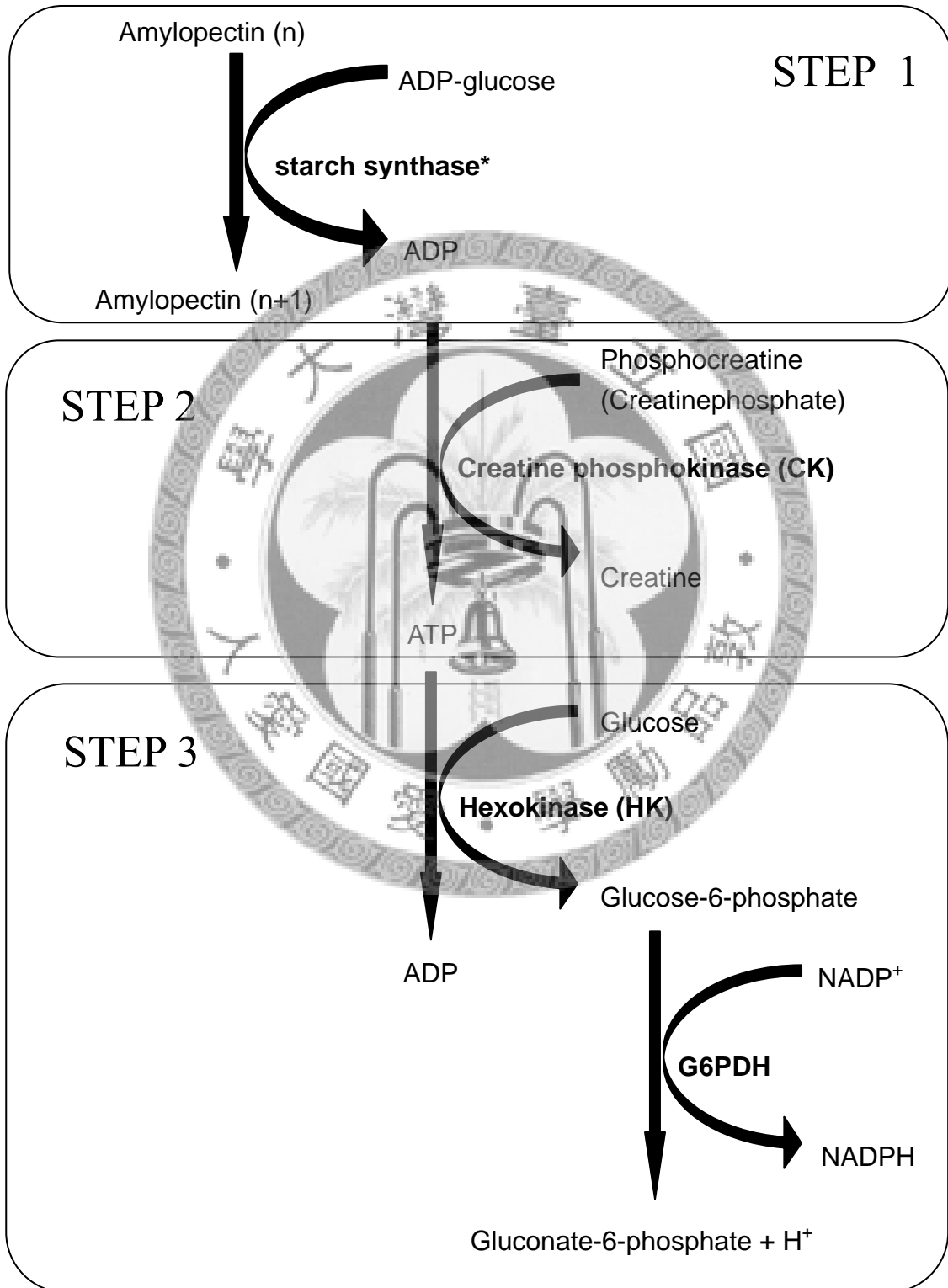
H_3BO_3	0.155 g/L
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.034 g/L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.058 g/L
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.013 g/L
MoO_3	0.007 g/L

使用前分別取1 mL之 A、B、C液調配為1 L 之水耕液，pH調整至4.7~4.8間。

附錄二

● Starch synthase 活性分析原理

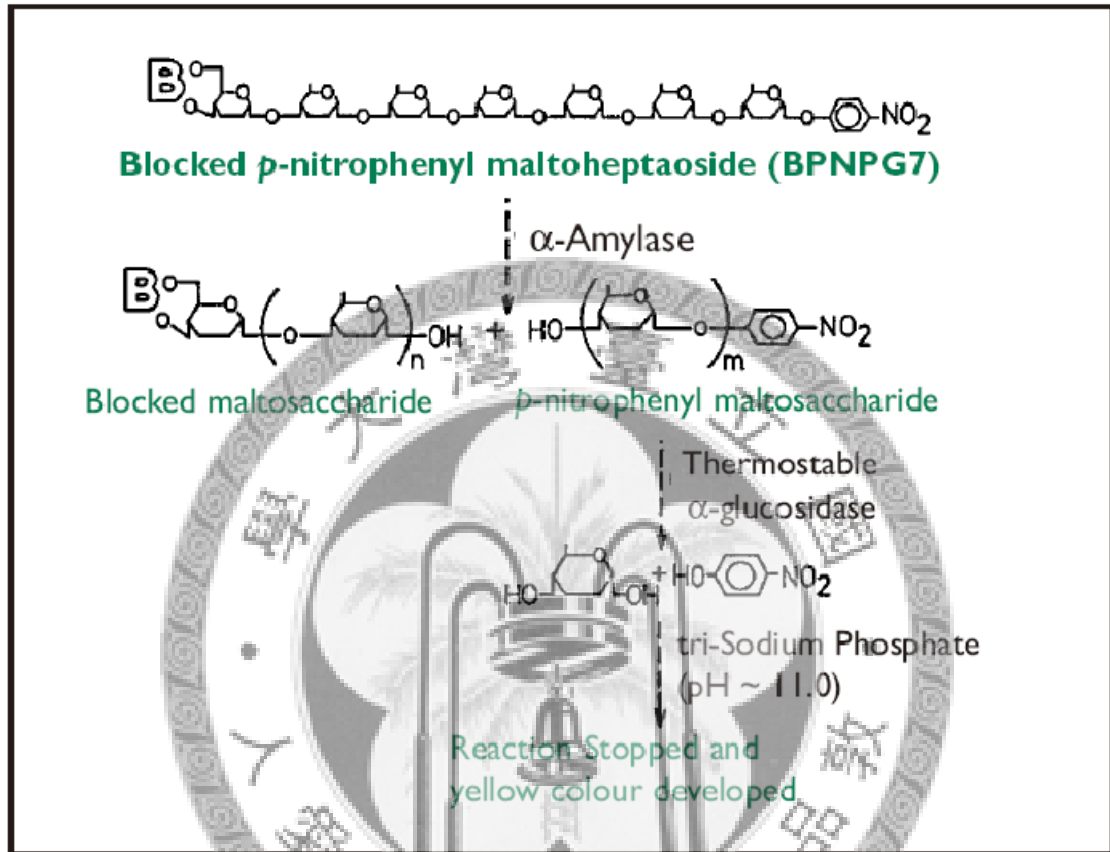
SSS與GBSS反應過程皆相同



附錄三

- α -amylase 活性分析原理

下圖節錄自Kit內所附之操作說明

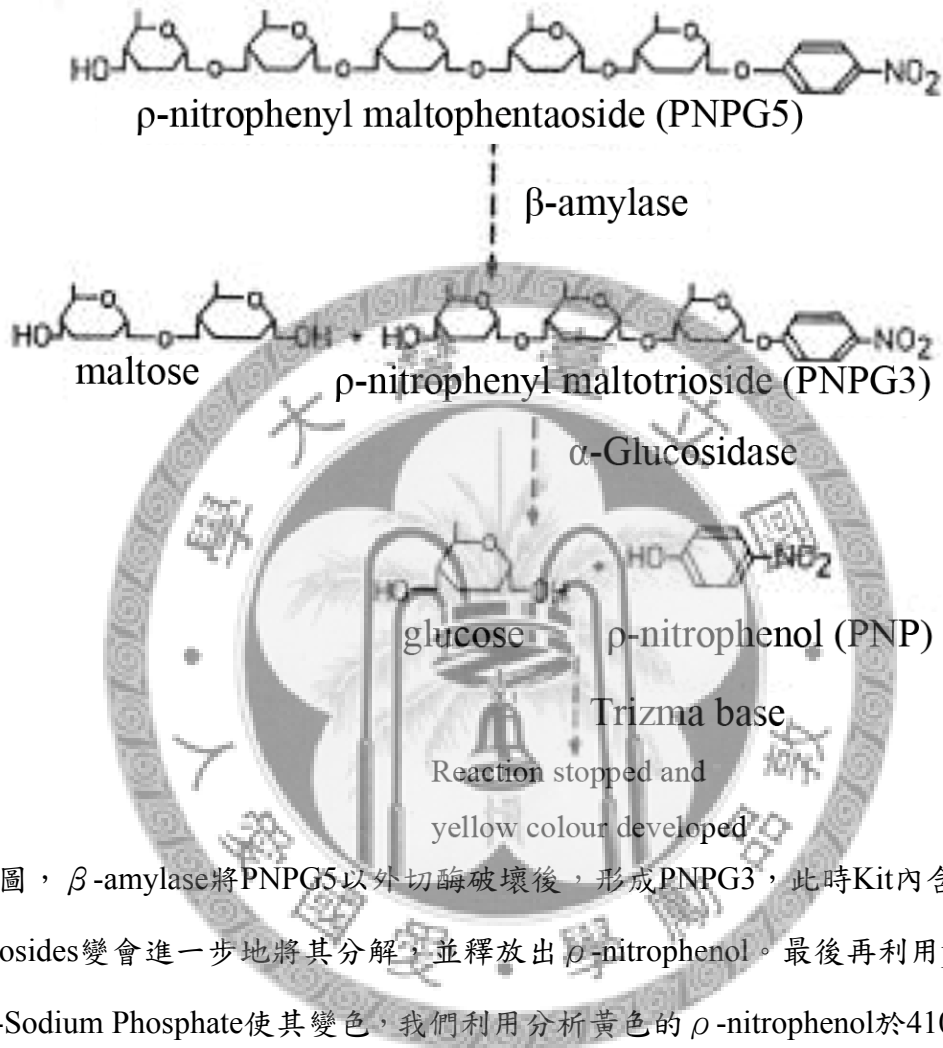


如上圖， BPNPG7是對 α -amylase有專一性的substrate。當 α -amylase將BPNPG7以內切酶破壞後，露出 p -nitrophenyl maltosaccharide的還原端，此時Kit內含的 α -glucosides變會進一步地將其分解，並釋放出 p -nitrophenol。最後再利用pH~11.0的tri-Sodium Phosphate使其變色，我們利用分析黃色的 p -nitrophenol於400 nm下之吸光值，確定其含量，並加以推算 α -amylase之活性。

附錄四

- β -amylase 活性分析原理

下圖節錄自Kit內所附之操作說明



如上圖， β -amylase將PNPG5以外切酶破壞後，形成PNPG3，此時Kit內含的 α -glucosidase變會進一步地將其分解，並釋放出 ρ -nitrophenol。最後再利用pH~11.0的tri-Sodium Phosphate使其變色，我們利用分析黃色的 ρ -nitrophenol於410 nm下之吸光值，確定其含量，並加以推算 β -amylase之活性。

本實驗利用 α -amylase酵素存在對PNPG5反應的延遲時期，嚴格控制反應時間以降低 α -amylase的干擾。